

Recesija i veterinarstvo

M. Tadić, Vera Tadić, D. Cvitković, Marina Pavlak i Vlasta Anić



Uvod

„Crni četvrtak” u listopadu 1929. postao je paradigma svjetske ekonomske krize. Podsjećanje na taj datum izaziva zebnju i pitanje može li se takva gospodarska kriza ponoviti i je li „sadašnja” kriza slična toj? Istodobno se nameće pitanje što je uzrokom sadašnjih dubokih poremećaja u svjetskom gospodarstvu i koje i kolike će biti posljedice te konačno koliko dugo će potrajati kriza? Poznato je koliko je dugo trajala i koje su bile posljedice Velike ekonomske krize (Velike depresije). Uzrok (ci) te krize manje su poznati.

Što je gospodarska (ekonomska) kriza? Nema suglasja među ekonomistima ni među gospodarstvenicima o definiciji gospodarske krize, a kamoli o njezinim uzrocima. Pretežito je stajalište da se o gospodarskoj krizi može govoriti u razdoblju negativnog gospodarskog razvoja. Iz dostupne literature moguće je razabrati da gospodarska kriza može imati tri faze ili tri načina na koja se očituje: faza stagnacije, faza recesije i

faza depresije. Stagnacijom se naziva razdoblje tijekom kojega BDP (bruto domaći proizvod) ostaje isti, nepromijenjen. Recesija je razdoblje tijekom kojega dolazi do smanjivanja BDP tijekom dva uzastopna kvartala. Depresija nastupa ako to smanjivanje potraje duže od dva kvartala (Wikipedija, 2009.). Dalić (2009.) navodi razlike između; stagnacije, recesije, depresije i ekonomske krize. Stagnaciju opisuje kao kratkoročnu oscilaciju ekonomske aktivnosti tijekom koje gospodarstvo bilježi pozitivne stope rasta koje su niže nego u prijašnjem razdoblju. Recesija pak označava pad ekonomske aktivnosti (pad industrijske proizvodnje, zaposlenosti, realnih dohodaka i trgovine) koji traje više mjeseci. Nasuprot tome depresija ili teška recesija traje dugo i uključuje pad domaćeg bruto proizvoda veći od 10 posto. Ekonomska i/ili financijska kriza označava slom gospodarstva kada država ne može financirati svoje obveze kao što su:

Dr. sc. Marko TADIĆ, dr. vet. med., redoviti profesor, dr. sc. Denis CVITKOVIĆ, dr. vet. med., viši asistent, dr. sc. Marina PAVLAK, dr. vet. med., docentica, Vlasta ANIĆ, dr. stom., Veterinarski fakultet, Zagreb; dr. sc. Vera TADIĆ, dr. vet. med., Ministarstvo vanjskih poslova i europskih integracija Republike Hrvatske

servisiranje duga, financiranje javnih potreba i dr. U Ekonomskom leksikonu (1995.) implicitno se navodi da su ekonomska kriza i recesija samo faze u poslovnom (gospodarskom) ciklusu koji se sastoji od ekspanzije i kontrakcije različitih ekonomskih procesa koji variraju u trajanju i intenzivnosti. Za ekonomsku se krizu navodi da predstavlja veći gospodarstveni poremećaj koji se u pretkapitalističkim društvima očitovao kao kriza nedovoljne proizvodnje zbog ratova, epidemija ili elementarnih nepogoda, a u kapitalističkom gospodarstvu očituje se kao kriza hiperprodukcije. Za recesiju se navodi da je ona svako lagano opadanje realnog društvenog bruto proizvoda tijekom dva ili više uzastopnih kvartala. Slične definicije o ekonomskoj krizi nalazimo i u Ekonomskom leksikonu (1975.). Navodi se da su ratovi, epidemije i elementarne katastrofe bile često uzrokom slabijih ili jačih gospodarstvenih kriza. U pretkapitalističkom društvu kriza se javlja kao kriza nedovoljne proizvodnje, a u kapitalističkom društvu kao kriza hiperprodukcije te da je povijest ekonomskih kriza vrlo duga. Krize različite intenzivnosti očitovale su se: 1763., 1793., 1810., 1815., 1825., 1836., 1847., 1857., 1866., 1873., 1882., 1890., 1900., 1907., 1920.-1921., 1929.-1933. i 1937. godine. Stojanov (2009.) navodi da je ekonomska kriza samo jedna od faza privrednog ciklusa kojega tvore ove faze; depresija, oporavak, ekspanzija, prosperitet, kriza i recesija. On dodaje da je ekonomska kriza najmanje definirana tema u ekonomskoj teoriji oko koje postoji najmanji stupanj suglasnosti teoretičara te navodi da jedna

skupina ekonomista identificira suvremenu krizu kao krizu nedovoljne potrošnje, dok druga skupina ekonomista drži da je ona samo posljedica prekomjerne potrošnje u prijašnjem razdoblju (osobne i investicijske).

Pretežito je mišljenje da je suvremena gospodarska kriza počela krizom hipotekarnih kredita u SAD koja je prerasla u financijsku krizu, a zatim u globalnu ekonomsku krizu te zahvatila i Hrvatsku pri kraju 2008. godine. Gospodarska kriza u Hrvatskoj ima odlike strukturne krize; visok inozemni dug, rastući deficit tekućeg računa platne bilance, proračunski deficit, visoka zaduženost stanovništva i visoka uvozna ovisnost (Hrvatska gospodarska komora, 2009.). Stoga je cilj ovog istraživanja bio analizirati djelotvornost poslovanja veterinarskih organizacija uoči recesije te ispitati stavove čelnika veterinarskih organizacija o recesiji u veterinarstvu.

Izvori podataka i metode rada

Podatke o djelotvornosti poslovanja veterinarskih organizacija od 2003. do 2007. godine prikupili smo iz datoteke PoslovneHrvatske.hr (2009.) i to za 56 veterinarskih stanica te 68 veterinarskih ambulanata. Statističkoj i ekonometrijskoj analizi podvrgli smo ove promjenljivice:

- Var₁ - Broj zaposlenih
- Var₂ - Prosječna neto plaća (€)
- Var₃ - Ukupni prihodi (1000 €)
- Var₄ - Prodaja (1000 €)

Var₅ - Dobit, bruto (1000 €)
 Var₆ - Dobit, neto (1000 €)
 Var₇ - Novostvorena vrijednost (1000 €)
 Var₈ - Potraživanja od kupaca (1000 €)
 Var₉ - Obveze prema dobavljačima (1000 €)
 Var₁₀ - Prosječna naplata (dana)
 Var₁₁ - Prosječno plaćanje (dana)
 Var₁₂ - Ukupna imovina (1000 €)
 Var₁₃ - Dugotrajna imovina (1000 €)
 Var₁₄ - Kratkotrajna imovina (1000 €)
 Var₁₅ - Nekretnine (1000 €)
 Var₁₆ - Udjeli i dionice (1000 €)
 Var₁₇ - Dugoročne obveze (1000 €)
 Var₁₈ - Kratkoročne obveze (1000 €)
 Var₁₉ - Temeljni kapital (1000 €).

Podatke o djelotvornosti poslovanja veterinarskih organizacija tijekom 2008. godine (34 organizacije) prikupili smo iz baze podataka Financijske agencije-FINA (2009.). Za poredbenu analizu služili smo se podacima tiskanim u izdanjima Državnog zavoda za statistiku Republike Hrvatske (1992.-2008.).

Prikupljene podatke, odjelito za veterinarske stanice i veterinarske ambulante te zajedno za sve veterinarske organizacije, obradili smo pripadnim statističkim postupcima uporabom računalnog programa STATISTIKA 8. Djelotvornost poslovanja veterinarskih organizacija istraživali smo uobičajenim ekonometrijskim postupcima.

Stavove čelnika veterinarskih organizacija (veterinarskih stanica i veterinarskih ambulanata) istraživali smo putem upitnice koju je tvorilo 19 pitanja. Upitnicu smo poslali elektronskom poštom (internetska upitnica) na e-mail adrese 150 veterinarskih organizacija. Kao nepoznate e-mail adrese vratile su

se upitnice upućene u 14 veterinarskih organizacija. Ispunjene upitnice dobili smo od 49 organizacija ili od njih 36,0%. Među 49 upitnica 5 ih je bilo tijekom istraživanja neuporabljivo.

Rezultati

Uoči recesije

U Hrvatskoj je godine 2007. bilo registrirano 231 veterinarska organizacija. Sve su one bile u privatnom vlasništvu, a djelatnost im je bila 852 (NKD 2002.), odnosno 75.00 (NKD 2007.). Pretežito su registrirane kao d.o.o. (n=140), manji broj kao d.d. (n=13) te 78 kao obrti (s.p.o.). Pretežito su to, prema broju zaposlenih, vrijednosti imovine i ostvarenim prihodima male ili pak vrlo male organizacije.

Osnovne rezultate istraživanja djelotvornosti poslovanja tih organizacija donosimo u tablicama 1 do 7 i grafikonima 1 do 2.

Temeljem podataka u tablici 1. razvidno je da je osnovni skup veterinarskih organizacija čije smo podatke o poslovanju analizirali vrlo nehomogen. Međusobno su se znatno razlikovale po svim pokazateljima djelotvornosti poslovanja. Najmanja razlika među njima bila je prema razini prosječne mjesečne plaće po zaposlenom. Razvidno je i da su veterinarske organizacije, prema broju zaposlenih, male organizacije. Većina ih zapošljava manje od 10 radnika, a svega njih jedna četvrtina zapošljava više od dvadeset radnika. Veterinarske stanice zapošljavaju u prosjeku znatno više (p = 0,000) radnika nego veterinarske ambulante. Razdioba

broja veterinarskih stanica prema broju zaposlenih znatno je asimetričnija od razdiobe broja veterinarskih ambulanaata prema istom pokazatelju (grafikon 1). Prije smo naznačili da je skup veterinarskih organizacija ($n=124$) najhomogeniji prema razini ostvarene prosječne mjesečne plaće zaposlenih ($V=33,6\%$). Homogeniji je pak bio skup veterinarskih stanica ($V=24\%$) nego veterinarskih ambulanaata ($V=37,0\%$). Osobito je to razvidno na grafikonu 2. Prosječna mjesečna plaća tijekom 2007. godine bila je znatno ($p=0,044$) veća u veterinarskim stanicama nego u veterinarskim ambulantaama.

Svi ostali pokazatelji djelotvornosti poslovanja veterinarskih organizacija (tablice 1, 2 i 3) u prisnoj su svezi s veličinom veterinarske organizacije (broj zaposlenih). Stoga su i razdiobe broja veterinarskih organizacija prema svim promjenljivicama ($Var_3 - Var_{19}$) u pravilu vrlo asimetrične i šiljaste.

Zanimljivo je naznačiti da je skup veterinarskih stanica ($n=56$) znatno homogeniji po svim izmjeriteljima uspješnosti poslovanja ($V_2=24\%$ do $V_{17}=191\%$) nego skup veterinarskih ambulanaata ($V_2=37\%$ do $V_6=470\%$).

Ako kao funkciji cilja poslovanja veterinarskih organizacija odredimo neto dobit (što je racionalan izbor) onda je razvidno da je njezina razina najovisnija o ostvarenoj novostvorenoj vrijednosti ($r=0,78$; $p<0,05$) te o ostvarenom ukupnom prihodu ($r=0,76$; $p<0,05$). Navodimo i ove razlike između sustava i djelotvornosti poslovanja veterinarskih stanica i veterinarskih ambulanaata tijekom 2007. godine (tablica 3). Novostvorena vrijednost tvorila je gotovo 50% ukupnog prihoda veterinarskih stanica i manje od trećine ukupnog

prihoda veterinarskih ambulanaata. Veterinarske su stanice imale znatno veća (77,7%) potraživanja od kupaca od obveza prema dobavljačima. Veterinarske su ambulante imale 19% veće obveze prema dobavljačima nego potraživanja od kupaca. Obje skupine organizacija u prosjeku su brže naplaćivale svoja potraživanja nego što su plaćala dugovanja. Razlika između ta dva razdoblja bila je 14 dana u slučaju veterinarskih stanica i 32 dana u slučaju veterinarskih ambulanaata. Razlika između te dvije skupine organizacija očituje se i strukturom njihove imovine. Dugotrajna imovina tvori 57% ukupne imovine veterinarskih stanica, a kratkotrajna imovina tvori 59% ukupne imovine veterinarskih ambulanaata.

Kratkoročne obveze tvore glavninu ukupnih obveza veterinarskih stanica (71%) i veterinarskih ambulanaata (80,0%). Izmjeritelji djelotvornosti poslovanja veterinarskih organizacija obračunani po zaposlenom upozoravaju na različnu razinu produktivnosti rada. Ostvareni prihod po zaposlenom 55,2% bio je veći u veterinarskim ambulantaama nego u veterinarskim stanicama, novostvorena vrijednost nije se znatno razlikovala ($p>0,05$), a neto dobit je bila 3% veća u veterinarskim stanicama (tablica 4).

Izmjeritelji rentabilnosti, likvidnosti i zaduženosti (tablica 6) svjedoče općenito o rentabilnom poslovanju veterinarskih organizacija te o njihovoj zadovoljavajućoj likvidnosti i zaduženosti. Ti su izmjeritelji povoljniji za veterinarske stanice nego za veterinarske ambulante.

Dinamička analiza poslovanja veterinarskih organizacija od 2003. do 2007. (tablice 5 i 7) svjedoči o relativno posto-

Tablica 1. Osnovni pokazivači poslovanja veterinarskih organizacija (n=124) tijekom 2007. godine

	Mean	Min.	Max.	Std.dev.	Coef.var.	Skewness	Kurtosis
Var1	15	0	88	16	106,9	2,0	4,2
Var2	696	101	1580	233	33,6	0,4	1,1
Var3	661	0	8400	1024	154,9	4,5	27,9
Var4	627	0	7900	968	154,3	4,5	27,4
Var5	33	-185	557	85	254,1	3,8	18,2
Var6	27	-185	444	71	260,7	3,4	15,9
Var7	300	0	2800	390	130,2	3,2	14,6
Var8	106	0	699	136	128,8	2,1	4,3
Var9	74	0	1300	141	191,9	5,8	46,6
Var10	66	4	365	56	85,1	2,7	11,7
Var11	91	0	365	73	80,3	0,9	0,4
Var12	487	7	3900	668	137,2	2,7	8,7
Var13	253	0	2800	442	175,2	3,4	13,5
Var14	231	2	3700	388	167,5	6,2	52,3
Var15	160	0	1500	254	159,2	2,8	9,0
Var16	24	0	1700	162	686,9	9,4	95,2
Var17	55	0	1000	127	232,1	4,4	25,8
Var18	158	0	3000	307	194,4	6,8	60,0
Var19	124	0	1200	193	155,6	3,3	13,2

janom, ali usporavajućem razvitku veterinarskih organizacija. Istodobno ona upozorava na pogoršanje općih ekonomskih uvjeta; ubrzano povećavanje obveza prema dobavljačima, produljivanje rokova plaćanja obveza te porast kratkoročnih obveza. Osobito se to odnosi na veterinarske ambulante.

Pokazatelji rentabilnosti, likvidnosti, zaduženosti i obrta ukupne imovine ukazuju na relativno stabilno poslovanje veterinarskih organizacija. Prije smo naznačili da smo za 2008. prikupili određene pokazatelje poslovanja za samo 34 veterinarske organizacije. Taj je uzorak bio vrlo nehomogen po svim ekonomskim pokazateljima ($V=233$ do 257%). Te su organizacije poslovale gotovo jednako ekonomično i rentabilno

2008. kao i 2007. godine. Njih 88% poslovale su godine 2008. ekonomično ili na granici ekonomičnosti, a 12% poslovalo ih je neekonomično.

Podrobnijom analizom dostupnih podataka o poslovanju veterinarskih organizacija „uoči“ recesije razvidni su znakovi nastupajuće financijske krize i recesije. Ubrzano povećavanje potraživanja od kupaca i obveza prema dobavljačima te razdoblja naplate potraživanja i plaćanja obveza očevidni su znakovi financijske krize (financijske nediscipline) i smanjivanja likvidnosti veterinarskih organizacija, osobito veterinarskih ambulanata. Jednako se može zaključiti temeljem podataka o dugoročnim i naročito kratkoročnim obvezama veterinarskih organizacija.

Tablica 2. Međuovisnost pojedinih izmjeritelja djelatnosti poslovanja veterinarskih organizacija tijekom 2007. godine
(Korelacijska matrica)

Correlations (Spreadsheet20)																			
Marked correlations are significant at p<0,5000																			
N=122 (Casewise deletion of missing data)																			
Variable	Var1	Var2	Var3	Var4	Var5	Var6	Var7	Var8	Var9	Var10	Var11	Var12	Var13	Var14	Var15	Var16	Var17	Var18	Var19
Var1	1,00	0,25	0,68	0,69	0,55	0,54	0,86	0,82	0,41	0,20	-0,11	0,64	0,53	0,51	0,63	0,15	0,25	0,37	0,58
Var2	0,25	1,00	0,37	0,38	0,34	0,32	0,42	0,35	0,16	0,08	-0,36	0,27	0,09	0,35	0,14	0,06	-0,02	0,22	0,08
Var3	0,68	0,37	1,00	1,00	0,76	0,74	0,78	0,74	0,80	0,05	-0,17	0,77	0,36	0,93	0,42	0,08	0,15	0,82	0,42
Var4	0,69	0,38	1,00	1,00	0,76	0,74	0,78	0,73	0,79	0,05	-0,17	0,77	0,35	0,92	0,41	0,09	0,14	0,81	0,40
Var5	0,55	0,34	0,76	0,76	1,00	1,00	0,78	0,53	0,44	0,10	-0,19	0,53	0,25	0,63	0,36	-0,01	-0,01	0,52	0,31
Var6	0,54	0,32	0,74	0,74	1,00	1,00	0,76	0,52	0,44	0,10	-0,18	0,52	0,25	0,63	0,35	-0,01	-0,02	0,52	0,32
Var7	0,86	0,42	0,78	0,78	0,78	0,76	1,00	0,75	0,39	0,17	-0,23	0,63	0,43	0,59	0,56	0,04	0,11	0,41	0,48
Var8	0,82	0,35	0,74	0,73	0,53	0,52	0,75	1,00	0,59	0,43	-0,00	0,78	0,56	0,71	0,55	0,13	0,32	0,58	0,59
Var9	0,41	0,16	0,80	0,79	0,44	0,44	0,39	0,59	1,00	0,15	0,23	0,72	0,31	0,88	0,31	0,11	0,32	0,94	0,31
Var10	0,20	0,08	0,05	0,05	0,10	0,10	0,17	0,43	0,15	1,00	0,31	0,21	0,21	0,12	0,20	0,02	0,19	0,11	0,25
Var11	-0,11	-0,36	-0,17	-0,17	-0,19	-0,18	-0,23	-0,00	0,23	0,31	1,00	0,07	0,16	-0,07	0,13	0,04	0,27	0,15	0,06
Var12	0,64	0,27	0,77	0,77	0,53	0,52	0,63	0,78	0,72	0,21	0,07	1,00	0,83	0,77	0,74	0,28	0,58	0,79	0,75
Var13	0,53	0,09	0,36	0,35	0,25	0,25	0,43	0,56	0,31	0,21	0,16	0,83	1,00	0,29	0,85	0,38	0,71	0,40	0,83
Var14	0,51	0,35	0,93	0,92	0,63	0,63	0,59	0,71	0,88	0,12	-0,07	0,77	0,29	1,00	0,30	0,05	0,16	0,91	0,35
Var15	0,63	0,14	0,42	0,41	0,36	0,35	0,56	0,55	0,31	0,20	0,13	0,74	0,85	0,30	1,00	0,04	0,75	0,36	0,63
Var16	0,15	0,06	0,08	0,09	-0,01	-0,01	0,04	0,13	0,11	0,02	0,04	0,28	0,38	0,05	0,04	1,00	0,03	0,12	0,37
Var17	0,25	-0,02	0,15	0,14	-0,01	-0,02	0,11	0,32	0,32	0,19	0,27	0,58	0,71	0,16	0,75	0,03	1,00	0,33	0,38
Var18	0,37	0,22	0,82	0,81	0,52	0,52	0,41	0,58	0,94	0,11	0,15	0,79	0,40	0,91	0,36	0,12	0,33	1,00	0,41
Var19	0,58	0,08	0,42	0,40	0,31	0,32	0,48	0,59	0,31	0,25	0,06	0,75	0,83	0,35	0,63	0,37	0,38	0,41	1,00

Tablica 3. Osnovni pokazivači poslovanja veterinarskih stanica (n=56) i veterinarskih ambulanti (n=68) tijekom 2007. godine

	Veterinarske stanice		Veterinarske ambulante		Mean ₂ /Mean ₁
	Mean ₁	Coef.var. ₁	Mean ₂	Coef.var. ₂	
Var ₁	26	69	6	70	0,23
Var ₂	749	24	668	37	0,89
Var ₃	1029	89	359	284	0,35
Var ₄	976	89	340	282	0,35
Var ₅	58	182	13	430	0,22
Var ₆	48	183	10	470	0,21
Var ₇	506	93	114	119	0,23
Var ₈	183	86	42	161	0,23
Var ₉	103	107	50	322	0,49
Var ₁₀	73	62	62	108	0,85
Var ₁₁	87	75	94	84	1,08
Var ₁₂	779	89	246	220	0,32
Var ₁₃	441	120	97	279	0,22
Var ₁₄	336	79	145	309	0,43
Var ₁₇	86	191	29	264	0,34
Var ₁₈	209	93	116	320	0,56
Var ₁₉	215	99	49	279	0,23

Tablica 4. Ostvareni rezultati poslovanja veterinarskih organizacija tijekom 2007. godine (€ po zaposlenom)

Oznaka promjenljivice:	Promjenljivica:	Veterinarske stanice (x ₁)	Veterinarske ambulante (x ₂)	x ₁ /x ₂
Var ₂	Prosječna neto plaća	749	668	1,12
Var ₃	Ukupni prihodi	39.475	61.266	0,64
Var ₄	Prodaja	37.451	58.078	0,65
Var ₅	Dobit, bruto	2.223	2.264	0,98
Var ₆	Dobit, neto	1.822	1.781	1,03
Var ₇	Novostvorena vrijednost	19.391	19.497	0,99
Var ₈	Potraživanja od kupaca	6.999	7.201	0,97
Var ₉	Obveze prema dobavljačima	3.942	8.462	0,47
Var ₁₂	Ukupna imovina	29.865	42.065	0,71
Var ₁₃	Dugotrajna imovina	16.928	16.583	1,02
Var ₁₄	Kratkotrajna imovina	12.886	24.804	0,52
Var ₁₅	Nekretnine	10.874	9.952	1,09
Var ₁₆	Udjeli i dionice	1.976	113	17,46
Var ₁₇	Dugoročne obveze	3.307	4.932	0,67
Var ₁₈	Kratkoročne obveze	8.008	19.832	0,40
Var ₁₉	Temeljni kapital	8.236	8.442	0,98

Tablica 5. Prosječne godišnje stope rasta (u %) pojedinih pokazivača poslovanja veterinarskih organizacija u Hrvatskoj od 2003. do 2007. godine

Oznaka promjenljivice:	Promjenljivica:	Veterinarske stanice	Veterinarske ambulante	Sve veterinarske organizacije
Var1	Broj zaposlenih	0,27	-0,59	0,08
Var2	Prosječna neto plaća (u €)	4,55	4,64	4,62
Var3	Ukupni prihodi (1000 €)	2,89	6,71	3,95
Var4	Prodaja (1000 €)	2,46	6,70	3,63
Var5	Dobit, bruto (1000 €)	25,77	22,78	25,08
Var6	Dobit, neto (1000 €)	11,80	16,41	12,69
Var7	Novostvorena vrijednost (1000 €)	5,66	8,25	6,19
Var8	Potraživanja od kupaca (1000 €)	1,82	8,91	3,17
Var9	Obveze prema dobavljačima (1000 €)	6,32	21,18	10,75
Var10	Prosječna naplata (dana)	1,65	4,75	3,16
Var11	Prosječno plaćanje (dana)	8,69	6,33	7,40
Var12	Ukupna imovina (1000 €)	3,94	11,57	5,24
Var13	Dugotrajna imovina (1000 €)	4,08	6,88	4,64
Var14	Kratkotrajna imovina (1000 €)	3,75	14,57	6,90
Var15	Nekretnine (1000 €)	...	...	...
Var16	Udjeli i dionice (1000 €)	...	...	...
Var17	Dugoročne obveze (1000 €)	1,14	6,99	2,68
Var18	Kratkoročne obveze (1000 €)	2,67	16,73	7,30
Var19	Temeljni kapital (1000 €)	2,21	1,55	2,06

Suočavanje s recesijom

Među 49 organizacija koje su nam poslale ispunjene upitnice, bile su 21 veterinarskih stanica i 17 veterinarskih ambulana. Sve su one imale status „ovlaštene veterinarske organizacije“.

Čelnici 6 organizacija nisu naznačili organizacijski oblik, odnosno tip svoje veterinarske organizacije. Pristigli podatci upozoravaju da su upitnicu ispunili čelnici „većih“ veterinarskih organizacija koji se istodobno češće i vještije koriste internetom. Prosječni

Tablica 6. Pojedini izmjeritelji djelotvornosti poslovanja veterinarskih organizacija tijekom 2007. godine

Izmjeritelji:	Veterinarske stanice	Veterinarske ambulante	Sve veterinarske organizacije
$R1 = (\text{Neto dobit} / \text{Ukupna imovina}) \times 100$	6,10	4,24	5,58
$R2 = (\text{Neto dobit} / \text{Temeljni kapital}) \times 100$	22,12	21,11	21,90
$K1 = \text{Kratkotrajna imovina} / \text{Kratkotrajne obveze}$	1,61	1,25	1,46
$K2 = \text{Ukupne obveze} / \text{Ukupna imovina}$	0,38	0,59	0,44
$K3 = \text{Ukupni prihod} / \text{Ukupna imovina}$	1,32	1,46	1,36

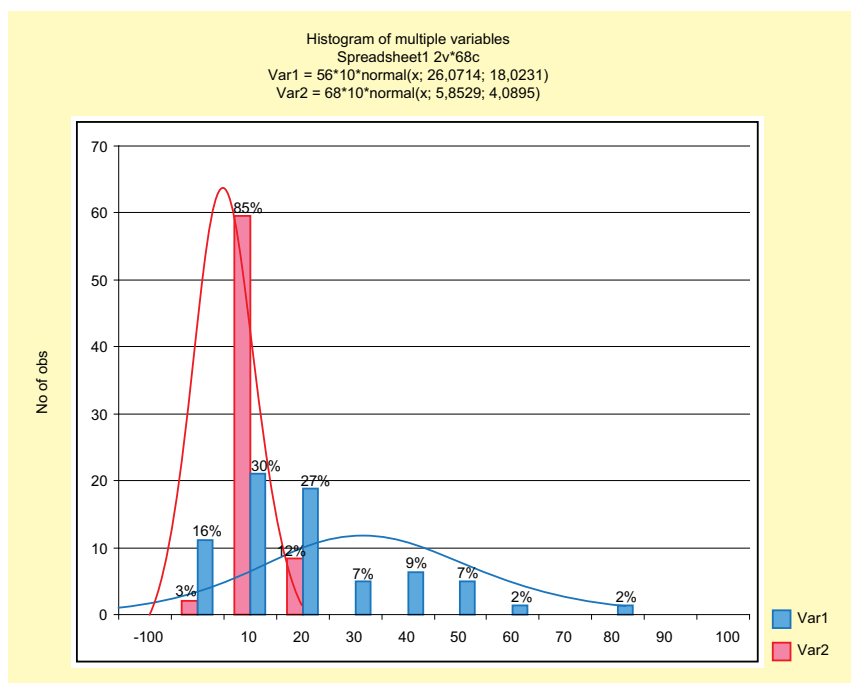
 R_1 = Neto rentabilnost imovine R_2 = Rentabilnost vlastitog kapitala K_1 = Koeficijent tekuće likvidnosti K_2 = Koeficijent zaduženosti K_3 = Koeficijent obrta ukupne imovine**Tablica 7.** Pojedini izmjeritelji djelotvornosti poslovanja veterinarskih organizacija od 2003. do 2007. godine

Godine:	R1	R2	K1	K2	K3
2003.	4,25	14,74	1,49	0,42	1,43
2004.	2,20	7,74	1,45	0,45	1,43
2005.	5,80	21,03	1,48	0,43	1,39
2006.	6,52	24,50	1,44	0,43	1,40
2007.	5,58	21,90	1,46	0,44	1,36

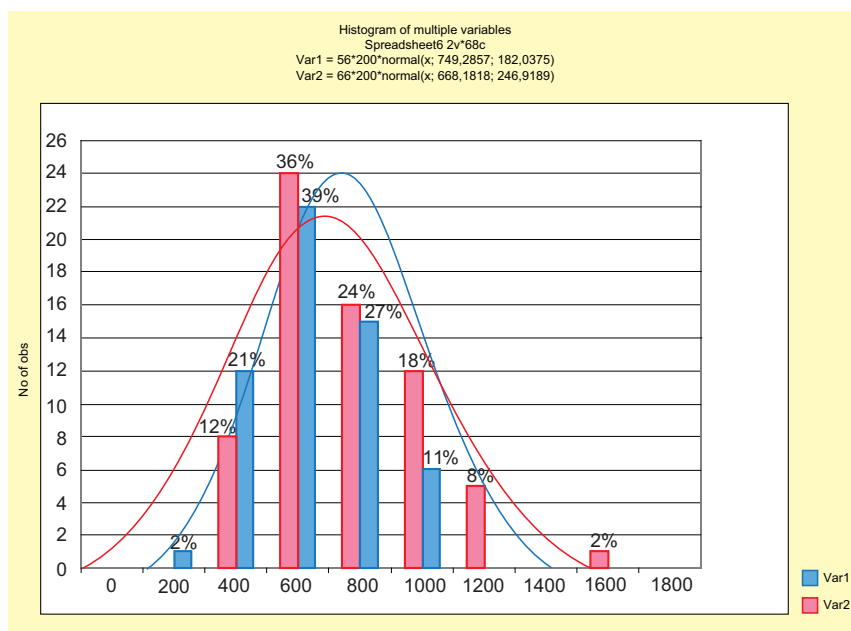
broj zaposlenih u tim organizacijama bio je godine 2008. 21 po organizaciji i bio je nepromijenjen u odnosu na godinu 2006. Nije se znatnije mijenjala ni struktura zaposlenih; doktori veterinarske medicine (veterinari) tvorili su više od polovice zaposlenih, pomoćni veterinarski radnici jednu petinu te ostali djelatnici jednu četvrtinu. Neprijeporno je to vrlo loša struktura zaposlenih radnika i ukazuje na „prekvalificiranost“ zaposlenih u veterinarskim organizacijama, odnosno da veterinari rade i one poslove koje jednako uspješno mogu obavljati radnici manje

formalne kvalificiranosti. Posredno je to upozorenje o „spremnosti“ veterinar na pristanak na nisku cijenu rada. Istodobno je to indikator neravnoteže između ponude i potražnje na tržištu rada veterinaru.

Razvidno je, prema pristiglim odgovorima na pitanja u upitnici, da su se čelnici veterinarskih organizacija suočili s ozbiljnim ekonomskim teškoćama već početkom 2009. godine jer već tijekom te godine planiraju „otpustiti“ 7% zaposlenih, a tijekom slijedeće tri godine planiraju smanjivati broj zaposlenih 8,35% prosječno godišnje. Najbrže će



Grafikon 1. Razdioba broja veterinarskih stanica (Var1) i veterinarskih ambulanata (Var2) prema broju zaposlenih godine 2007.



Grafikon 2. Razdioba broja veterinarskih stanica (Var1) i veterinarskih ambulanata (Var2) prema prosječnoj mjesečnoj neto plaći (€) godine 2007.

se smanjivati broj pomoćnih veterinarskih radnika (9,77%) te ostalog osoblja (9,72%), a tek nešto sporije broj zaposlenih veterinarara (7,28%).

Ispitanici, njih 95,3%, drže da je veterinarska djelatnost (praksa) u recesiji. Gotovo tri četvrtine ispitanika izjavilo je da je recesija u veterinarskoj praksi jaka (35,7%) ili pak vrlo jaka (38,1%). Prema mišljenju ispitanika recesija se najviše očituje (56,1%) na području poslova temeljenih na javnom ovlaštenju te na području liječenja farmских životinja (34,1% ispitanika). Zanimljivo je naznačiti da čelnici veterinarskih organizacija ne „osjećaju” recesiju u veterinarskoj praksi s kućnim ljubimcima. Temeljem tih podataka posredno je moguće zaključiti da je neuredno plaćanje veterinarskih usluga iz proračuna države ili jedinica lokalne uprave i samouprave glavni krivac za recesiju u veterinarstvu, a tek onda recesija u poljoprivredi, odnosno stočarstvu. Istodobno to ukazuje i na strukturu djelatnosti veterinarskih organizacija.

Tri četvrtine čelnika veterinarskih organizacija navode da se smanjuje potražnja za svim vrstama veterinarskih usluga, a osobito za liječenjem farmских životinja, umjetnim osjemenjivanjem plotkinja i poslovima temeljenim na javnom ovlaštenju. U većini pak veterinarskih organizacija povećava se broj usluga pruženih kućnim ljubimcima. Ispitanici navode da se ekonomska kriza očituje: 1. teškoćama pri naplati potraživanja, 2. smanjivanjem potražnje veterinarskih usluga, 3. povećavanjem troškova poslovanja i 4. nepovoljnim uvjetima kreditiranja poslovanja.

Dvije će trećine ispitanika na recesiju reagirati smanjivanjem broja zaposlenih i istodobnim smanjivanjem plaća zaposlenima. Petina ih planira smanjiti cijene usluga, a dvije petine ih planira povećati cijene usluga. Više od petine čelnika veterinarskih organizacija na recesiju kani reagirati povećavanjem obujma usluga. Tri će četvrtine organizacija odustati od planiranih investicija, a njih 51% će odustati od već započetih investicija. Više od 60% ispitanika izlaz iz recesije vide u proširivanju djelatnosti svoje organizacije. Zabrinjava i o ozbiljnosti recesije u veterinarstvu svjedoči podatak da jedna petina ispitanika (veterinarskih organizacija) planira napustiti djelatnost, odnosno prestati s poslovanjem.

Većina veterinarskih organizacija (90,1%) poslovale su tijekom 2008. uspješno ostvarujući profit. Tijekom 2009. trećina ih očekuje da će poslovati s gubitkom.

Zanimljivo je da je veći broj ispitanika koji drže da je recesija posljedica recesije u svijetu (54,8%) nego onih koji za recesiju u veterinarstvu odgovornim drže Vladu Republike Hrvatske (45,2%). Većina ispitanika skeptični su oko predvidivog trajanja recesije. Njih četiri petine drže da će recesija trajati duže od dvije godine.

Posredno se može zaključiti da su čelnici veterinarskih organizacija nezadovoljni institucionalnim okruženjem. Većina ispitanika posve su nezadovoljni odredbama pripadnih zakona koji utječu na funkcioniranje i djelotvornost veterinarstva: Zakon o veterinarstvu, Zakon o veterinarsko-medicinskim proizvodima, Zakon o

stočarstvu, Zakon o zaštiti životinja, Zakon o hrani. Krivicu za sadašnju „opću krizu“ u veterinarstvu, čelnici veterinarskih organizaciju pripisuju poglavito Upravi za veterinarstvo pri Ministarstvu poljoprivrede, ribarstva i ruralnog razvoja te Hrvatskoj veterinarskoj komori. Svoj vrlo kritički stav prema pojedinim veterinarskim institucijama zorno su izrazili ocjenjujući njihov rad ocjenom od 1 do 5. Najnižim ocjenama vrednovali su rad Uprave za veterinarstvo (2,20) i Hrvatske veterinarske komore (2,57), a s najvišim rad Hrvatskog veterinarskog instituta (3,85) i Veterinarskog fakulteta (3,51).

Čelnici veterinarskih organizacija drže da bi se gospodarska kriza u veterinarstvu mogla najdjelotvornije ublažiti izdvajanjem Uprave za veterinarstvo iz sastava Ministarstva poljoprivrede, ribarstva i ruralnog razvoja, izmjenama Zakona o veterinarstvu, zadržavanjem instituta „ovlaštene“ veterinarske inspekcije i subvencioniranjem troškova pojedinih veterinarskih usluga.

Rasprava

Neprijeporno je da je hrvatsko gospodarstvo u recesiji i da je ona zahvatila sve djelatnosti. Veterinarstvo, odnosno veterinarske organizacije nisu iznimka.

Veterinarske organizacije u Hrvatskoj, veterinarske stanice i veterinarske ambulante (inokosne privatne veterinarske prakse) pretežito su male organizacije prema broju zaposlenih i prema razini ostvarenog ukupnog pri-

hoda¹. Veterinarske su stanice u pravilu veće organizacije od veterinarskih ambulana. Te dvije vrste veterinarskih organizacija međusobno se bitno razlikuju po ustrojstvu i ukupnim rezultatima poslovanja, ali ne i značajno po djelotvornosti poslovanja.

Oba tipa organizacija karakterizira ekstenzivan tip razvoja koji je u znatnoj mjeri posljedica historijskog nasljeđa obilježenog masovnošću, feminizacijom i pauperizacijom veterinarske profesije (Tadić, 1990.) s posljedicom trajnog pogoršavanja ekonomskog položaja veterinarskih organizacija (Tadić i Tadić, 1979.). Razvidno je to po činjenici da je tijekom 2007. godine u veterinarskim organizacijama (n=231) bilo ukupno zaposlenih 3.520 ili u prosjeku 15,2 radnika po organizaciji od kojih 46,6% veterinara, 5,4% djelatnika drugačije visoke stručne spreme i 47,9% ostalih radnika. Odnos broja veterinara i ostalih djelatnika bio je te godine 1:1,14 što je zoran primjer ekstenzivnog zapošljavanja (rada) veterinara. U Hrvatskoj je tako 2008. godine na 10.000 standardnih grla stoke (SGS= 250 kg) bilo zaposleno 25,65 veterinara. Taj je broj u pojedinim državama bio

1 Službena definicija malog gospodarstva i malog gospodarskog subjekta u Hrvatskoj glasi: Malo gospodarstvo u Hrvatskoj čine subjekti koji: zapošljavaju prosječno godišnje manje od 250 radnika, neovisni su u poslovanju, ostvaruju ukupni godišnji promet od 60 milijuna kuna ili imaju zbroj bilanci (ako su obveznici poreza na dobit), odnosno imaju dugotrajnu imovinu (ako su obveznici poreza na dohodak) u vrijednosti do 30 milijuna kuna. Subjekti malog gospodarstva su fizičke i pravne osobe koje samostalno i trajno obavljaju dopuštenu djelatnost radi ostvarivanja dobiti i dohotka na tržištu. Razlikuju se mikro, mali i srednji subjekti malog gospodarstva.

kako slijedi; Australija 2,99, Danska 6,10, Kanada 7,91, Austrija 9,91, Finska 15,47, Njemačka 15,26, Italija 20,84, Portugal 12,41, Švedska 11,56, Velika Britanija 14,94, SAD 11,39, Slovenija 1,45 (O.I.E., 2009.). Ekstenzivnom tipu zapošljavanja veterinara u Hrvatskoj osobito su pogodovale strukturne promjene u hrvatskom gospodarstvu, a osobito u poljoprivredi te posljedice tih promjena na razvitak poljoprivrede u cjelini i odjelito stočarstva između 1990. i 2007. godine. U tom se razdoblju obujam poljoprivredne proizvodnje smanjivao 1,6% prosječno godišnje, a mnoštvenost stoke po ovim negativnim stopama: goveda 3,09% svinja 0,32%, ovaca 0,58% i peradi 3,06%. Istodobno je došlo i do smanjivanja proizvodnje prirasta goveda 2,58% prosječno godišnje, prirasta svinja 2,01% i ovaca 1,07% te proizvodnje mlijeka 0,37% i jaja 1,41%.

Te su se tendencije očitovale sporijim porastom ostvarenog ukupnog prihoda svih veterinarskih organizacija u razdoblju od 2003. do 2007. Taj porast bio je između 0,44 i 6,01% godišnje. Istodobno se društveni bruto proizvod Hrvatske povećavao između 4,2 i 5,6% godišnje pa je udio ukupnog prihoda veterinarskih organizacija u društvenom bruto proizvodu Hrvatske bio između 0,41 i 0,50% godišnje.

Udio broja zaposlenih u veterinarskim organizacijama u ukupnom broju zaposlenih u Hrvatskoj bio je godine 2007. 0,24%. Temeljem tih podataka moglo bi se zaključiti da je ekonomski položaj veterinarskih organizacija „ravnotežan“. Takav bi zaključak bio posve pogrešan zbog činjenice da je

među zaposlenima u Hrvatskoj te godine bilo svega 15,5% onih s visokom stručnom spremom, a u veterinarskim organizacijama 52% što je neprijeporan dokaz izrazito niske cijene rada veterinarskih organizacija.

Dokaz za tu tvrdnju je i činjenica da je prosječna mjesečna plaća u veterinarskim organizacijama od 2003. do 2007. bila samo 8,5% veća od prosječne mjesečne plaće u pravnim osobama u Hrvatskoj i da se sporije povećavala (3,5% prosječno godišnje) nego u potonjim organizacijama (5,28% prosječno godišnje). Istodobno je bila 7% manja nego u djelatnosti zdravstvene zaštite i socijalne skrbi te 6% manja nego u javnoj upravi iako su te dvije potonje djelatnosti imale 60% nižu kvalifikacijsku strukturu zaposlenih.

Upravo je to glavna „tajna“ ekonomičnog i rentabilnog poslovanja veterinarskih organizacija. Istodobno je to i „tajna“ i uzrok trajnijeg i očividnog gubljenja ugleda veterinarske profesije.

Stavovi čelnika veterinarskih organizacija svjedoče da su oni uočili bitne znakove recesije. Posredno se može zaključiti da glavne uzroke recesije u veterinarstvu vide u neprimjerenom funkcioniranju države, a osobito pojedinih organa državne uprave te institucionalnom okruženju u kojemu djeluju veterinarske organizacije (Zakon o veterinarstvu i pripadni provedbeni propisi).

Njihov pristup sučeljavanju s recesijom je racionalan (štednja i pokušaj povećavanja i diverzifikacija usluga). Zanimljivi su stavovi čelnika veterinarskih organizacija o utjecaju prilagodbe veterinarskog zakonodavstva Hrvatske

propisima Europske Unije na veterinarsku praksu (organizacije) u Hrvatskoj. Čelnici veterinarskih organizacija mogli bi se po svojim stavovima svrstati u „euroskeptike“.

Temeljem rezultata istraživanja može se pretpostaviti da će recesija ozbiljno zahvatiti sve veterinarske organizacije. Ona bi mogla biti znatnija u veterinarskim ambulantama nego u veterinarskim stanicama i to zbog strukture imovine i obveze, a napose zbog pretežitog broja usluga čija je potražnja elastična na razinu cijena i dohotka klijenata. Likvidnost će „države“ također znatno utjecati na dubinu i trajanje recesije u veterinarskim organizacijama, a osobito onima s javnim ovlaštenjima.

Sažetak

Kriza hipotekarnih kredita u SAD tijekom 2008. godine ubrzo je prerasla u financijski krizu diljem svijeta, a zatim u recesiju. Recesija je zahvatila i Hrvatsku, odnosno sve djelatnosti pa tako i veterinarstvo, odnosno veterinarsku praksu. Stoga je cilj ovog istraživanja bio analizirati djelotvornost poslovanja veterinarskih organizacija u Hrvatskoj (n=124) između 2003. i 2007. godine te ispitati stavove čelnika veterinarskih organizacija o recesiji u veterinarstvu.

Rezultati istraživanja svjedoče da su veterinarske organizacije poslovale, u označenom razdoblju, ekonomično i rentabilno ponajprije zbog štedljivosti, odnosno upravljanja poslovanjem po načelu „dobrog privrednika“, a

manje zbog povoljnog i stabilnog gospodarskog okruženja. I u tom su se razdoblju očitovali znaci nadolazeće financijske krize i recesije; sve veća zaduženost, sve manja likvidnost i sve slabija financijska disciplina. Čelnici veterinarskih organizacija svjesni su ozbiljnosti recesije. Recesiji se kane suprotstaviti smanjivanjem broja zaposlenih, smanjivanjem plaća te diverzifikacijom i povećavanjem obujma usluga. Dugoročno ekstenzivan tip (masovnost, feminizacija i pauperizacija) razvoja veterinarstva dodatno će otežati izlazak veterinarstva iz recesije.

Literatura

1. EKONOMSKI LEKSIKON (1975): Savremena administracija. Beograd.
2. EKONOMSKI LEKSIKON (1995): Leksikografski zavod «Miroslav Krleža» i Masmedia, Zagreb.
3. TADIĆ, M. i VERA TADIĆ (1979): Ekonomika rada veterinarskih stanica u SR Hrvatskoj. Vet. stn. 9, 54-64.
4. TADIĆ, M. (1990): Veterinarstvo i veterinarska profesija u novim društvenim i gospodarstvenim uvjetima. Vet. stn. 21, 281-287.
5. Odluka o Nacionalnoj klasifikaciji djelatnosti - NKD 2002. NN 13/2003.
6. Odluka o Nacionalnoj klasifikaciji djelatnosti - NKD 2007. NN 58/2007.

Literatura s interneta

1. DALIĆ, MARTINA (2009): *Stagnacija, recesija, depresija i kriza - četiri razine pogoršanja*. [online]. Dostupno na: <http://www.liderpress.hr/Default.aspx?sid=51668> [18.05.2009.].
2. FINACIJSKA AGENCIJA-FINA (2009): *Javna objava podataka iz registra*

- godišnjih financijskih izvještaja. [on line]. Dostupno na: <http://www.fina.hr/Default.aspx?sec=915> [12.06.2009].
3. HRVATSKA GOSPODARSKA KOMORA (2009): *Prijedlog mjera za ublažavanje krize u RH*. [online] Dostupno na: http://www2.hgk.hr/mjere/mjere_pdf.pdf [18.05.2009.].
 4. PoslovnaHrvatska.hr (2009): [on line]. Dostupno na: <http://www.poslovnahrvatska.hr/home.aspx> [12.06.2009].
 5. STOJANOV, D. (2009): *Suvremenost Marxove teorije ekonomskih kriza: naučene*
 - lekcije povijesti*. [online]. Dostupno na: http://www.rifin.com/pdf/Stojanov_Marx.pdf [22.05.2009.].
 6. WAHID Interface-OIE World Animal Health Information Database (2009): *Veterinarians and paraveterinarians*. [on line]. Dostupno na: <http://www.oie.int/wahis/public.php?page=home> [04.06.2009.].
 7. WIKIPEDIJA (2009): *Gospodarska kriza*. [on line]. Dostupno na: http://hr.wikipedia.org/wiki/Gospodarska_kriza [08.06.2009.].

Recession and veterinary practice

Marko TADIĆ, DVM, Ph.D., Full Professor, Faculty of Veterinary Medicine Zagreb; Denis CVITKOVIĆ, DVM, Ph.D., Senior Assistant, Marina PAVLAK, DVM, Ph.D., Assistant Professor; Vlasta ANIĆ, DDS, Faculty of Veterinary Medicine Zagreb; Vera TADIĆ, DVM, Ph.D., Scientific Advisor, Ministry of Foreign Affairs and European Integration

The crisis with mortgage loans in the USA during 2008 soon became a worldwide crisis, and then recession. The recession affected Croatia as well as different types of business, including veterinary profession, or veterinary practice. Therefore, the main goal of this research was to analyze the effectiveness of performance of different veterinary organizations in Croatia (n=124) between 2003 and 2007, and to determine the attitude of leaders in veterinary organizations on recession in veterinary practice.

The results of the research show that veterinary organizations' performance, within the above mentioned period of time, was cost-efficient and profitable, and especially so because such organizations were careful about spending, doing business on the princi-

ple of "good management", and less as a result of favourable and stable business environment. Nevertheless, even during that period there were signs of the oncoming financial crisis and recession; higher indebtedness, lower liquidity and poorer financial discipline. The leaders of different veterinary organizations are aware of the seriousness of recession, and they intend to fight the effects of recession through decreasing the number of employees, lowering their salaries, and diversification and increasing of the scope of services which they offer. Long-term extensive type (massive approach, feminization and pauperization) of development of veterinary profession will make it even more difficult for the veterinary practice to come out of the crisis.

Ecocid® S

SIGURAN I DJELOTVORAN

- ▶ Univerzalni visoko djelotvoran dezinficijens za sigurnu i vrlo učinkovitu zaštitu od uzročnika zaraznih bolesti koje ugrožavaju zdravlje ljudi i životinja.
- ▶ Dezinficijens širokog spektra virucidnog, baktericidnog i fungicidnog djelovanja.
- ▶ Vodotopivi prašak, namjenjen za opću uporabu te za profesionalne i industrijske korisnike.
- ▶ Siguran za okoliš, ljude i životinje.
- ▶ Kompatibilan je sa HACCP.



Sastav Ecocid S je uravnotežena stabilizirana smjesa peroksidnih spojeva, površinski aktivne tvari, organske kiseline i anorganskog puferuskog sustava. **Uputa za uporabu** Radna otopina Ecocida S koristi se u obliku spreja, magle, kupke za papke te dezinfekcijske barijere. **Za dezinfekciju prethodno očišćenih površina i opreme pripremite 1% otopinu Ecocida S. Oprema** Kutija sa 25 vrećica po 50 g praška, vrećica po 1 kg i 2,5 kg praška.

Biocide koristite s oprezom. Prije uporabe obavezno pročitajte upute i podatke o proizvodu.



Naša inovativnost i znanje posvećeni su zdravlju. Zbog toga naša odlučnost, ustrajnost i iskustvo zajedno doprinose jednom cilju - razvoju djelotvornih i neškodljivih proizvoda vrhunske kvalitete.

Detaljnije informacije možete dobiti od firme:

KRKA - FARMA d.o.o., Radnička cesta 48/II, p.p. 205, Zagreb 10002, Telefon 01/63 12 100, 63 12 101, Faks 01/61 76 739, E-mail: kika-farma@zg.htnet.hr, www.kika-farma.hr

Mjerna nesigurnost rezultata analize sadržaja florfenikola u otopinama za injekcije

Ksenija Šandor, Svjetlana Terzić, Miroslav Andrišić i Irena Žarković



Uvod

Mjerenja se raznih fizikalnih i kemijskih veličina ne mogu provesti apsolutno točno. Naime, savršeno mjerenje ne postoji jer na svaki mjerni proces utječu razne varijabilnosti poput nesavršenosti mjerila, malih promjena u okolišnim uvjetima i/ili mjernom postupku i slično. Da bi konačan rezultat analize bio transparentan potrebno je netočnost mjerenja svesti na najmanju moguću mjeru te sa što većom sigurnošću ustvrditi kolika je mjerna nesigurnost rezultata. Termin „nesigurnost rezultata“ (Anon. 2007.) ne govori o tome da je taj rezultat nepouzdan ili nesiguran, nego označava procjenu pridruženu rezultatu koja opisuje područje vrijednosti unutar kojega se s utvrđenom razinom povjerenja ocjenjuje da se nalazi prava vrijednost rezultata. Procjenjivanje mjerne nesigurnosti zahtijeva stručni uvid u proces mjerenja, a to znači prepoznavanje, kvalifikaciju i kvantifikaciju svih mogućih izvora nesigurnosti te takva

procjena mjerne nesigurnosti povećava povjerenje u dobiveni rezultat.

Šira primjena harmoniziranog postupka procjene nesigurnosti dogodila se izdavanjem Upute za iskazivanje mjerne nesigurnosti (Anon. 1995.a). Načela Upute temelje se na tome da se svaka sastavnica nesigurnosti procjenjuje sa standardnim odstupanjem (u_i), potom se te procjene udružuju putem sume kvadrata u sastavljenu standardnu nesigurnost (u_c) i u konačnici se računa proširena mjerna nesigurnost (U) uz pomoć obuhvatnog faktora (k).

Za svaku ulaznu veličinu treba odrediti statistički model koji opisuje koje su moguće vrijednosti ulazne veličine te koje su moguće učestalosti tih vrijednosti, odnosno vjerojatnosna razdioba (pravokutna, trokutasta, Gaussova ili uniformna razdioba). Parametri vjerojatnosnih razdioba određuju se iz ograničenog broja podataka, uglavnom podataka dobivenih postupkom vrednovanja metode, ta-

Ksenija ŠANDOR, dipl. inž. kemije, dr. sc. Svjetlana TERZIĆ, dr. vet. med., znanstvena savjetnica, Miroslav ANDRIŠIĆ, dr. vet. med., Irena ŽARKOVIĆ, dr. vet. med., Hrvatski veterinarski institut, Zagreb

kozvanom validacijom metode (Anon. 1995.b, Anon. 1998.). Statistički podatci su procjene vrste A koje se zasnivaju na bilo kojoj statističkoj metodi obrade eksperimentalnih podataka. Nestatistički podatci su procjene vrste B koje se temelje na stručnoj prosudbi raspoloživih podataka i o iskustvu procjenitelja.

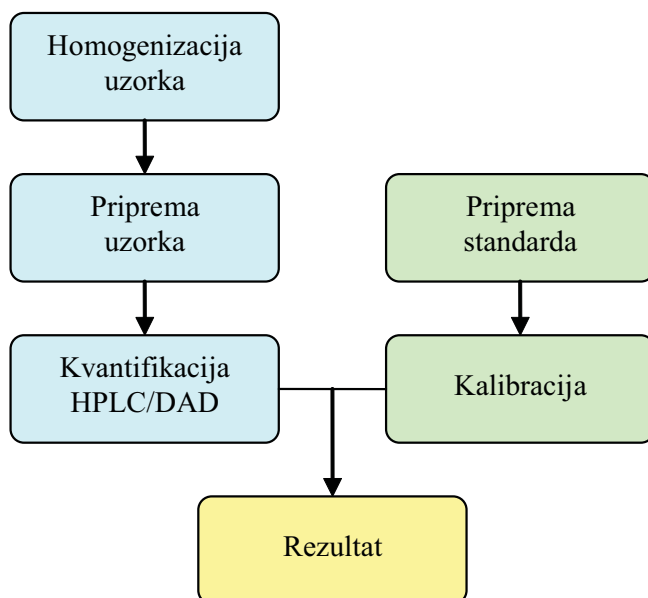
Materijali i metode

Određivanje sadržaja florfenikola provedeno je na parenteralnim pripravcima Floron® otopini za injekcije (Krka d.d., Slovenija) i Nuflor® otopini za injekcije (Essex A. H., Schering – Plough, Njemačka). Navedeni veterinarsko-medicinski proizvodi (VMP) odobreni su za uporabu u Republici Hrvatskoj (N.N., 119/2007., N.N., 63/2006.). Masene koncentracije florfenikola određene

su na SpectraSystem HPLC sustavu s računalnim programom ChromQuest Ver. 4.2 (Thermo Separation Products, SAD) pri sobnoj temperaturi metodom vanjskog standarda. Detektor s nizom dioda (DAD) primijenjen je za detekciju uzorka i snimanje spektra na 254 nm. Korištena je kolona obrnute faze LiChrospher RP-18 e (5µm, 125 × 4 mm i.d., Merck, Njemačka). Za pripremu otopina standarda i uzoraka korištena je HR-202 analitička vaga (AND, Velika Britanija). Rezultati su statistički obrađeni primjenom računalnog programa Excel (Microsoft® Office Excel 2003).

Rezultati

Eksperimentalni podatci dobiveni su u postupku validacije određivanja sadržaja florfenikola u VMP (slika 1.) metodom tekućinske kromatografije



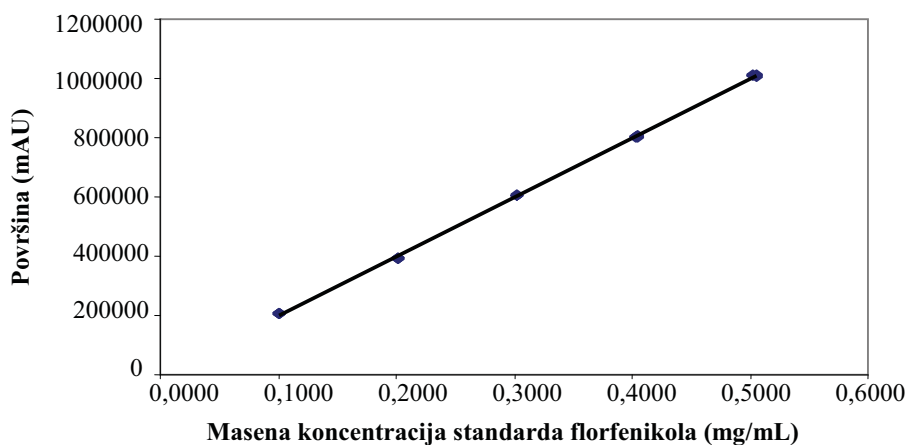
Slika 1. Opis postupka određivanja florfenikola HPLC metodom

visoke djelotvornosti (eng. High performance liquid chromatography, HPLC). Linearnost odziva florfenikola (slika 2.) provjerena je priređivanjem i kromatografiranjem dvije paralelne probe s po 5 baždarnih otopina certificiranog referentnog materijala florfenikola (Dr. Ehrenstorfer GmbH, Njemačka).

Baždarne otopine sadržavaju florfenikol u koncentracijama od 33% do 167% nazivne koncentracije (0,3 mg/mL). Jednadžba linearne regresije (1) glasi:

$$P = 1999538,4 \gamma_0 - 535,4 \quad (1)$$

gdje je P površina, a γ_0 masena koncentracija florfenikola.



Slika 2. Linearna proporcionalnost koncentracije i površine pika florfenikola

Tablica 1. Točnost pripreme uzoraka otopina za injekcije

Razina konc. (%)	Dodano (mg/mL)	Nađeno (mg/mL)	Iscrpak (%)
80	0,2424	0,2392	98,7
	0,2424	0,2412	99,5
	0,2424	0,2402	99,1
100	0,3030	0,2951	97,4
	0,3030	0,2961	97,7
	0,3030	0,2961	97,7
120	0,3636	0,3577	98,4
	0,3636	0,3597	98,9
	0,3636	0,3597	98,9
Srednja vrijednost (%)			98,5
Standardna devijacija			0,73
RSD %			0,74

Tablica 2. Ponovljivost pripreme uzoraka otopina za injekcije

Uzorak	m_{uzorka} (g)	d	$V_{\text{razrjeđenja}}$ (mL)	P_{uzorka}	$\gamma_{\text{florfenikola}}$ (mg/mL)
Floron® otopina za injekciju	0,1228	1,17	100	611139	291,46
	0,1231	1,17	100	622430	296,12
	0,1227	1,17	100	609484	290,91
	0,1212	1,17	100	606964	293,29
	0,1240	1,17	100	612229	289,15
	0,1187	1,17	100	601279	296,67
Nuflor® otopina za injekciju	0,1201	1,17	100	623010	303,80
	0,1205	1,17	100	616778	299,76
	0,1209	1,17	100	609262	295,13
	0,1198	1,17	100	602013	294,30
	0,1188	1,17	100	600383	295,98
	0,1175	1,17	100	608469	303,28

U svrhu ispitivanja točnosti mjerenja (Anon. 2000.), uzorak u triplicatu cijepjen je s odgovarajućim količinama analita i to 80, 100 i 120% od nominalne koncentracije (tablica 1). Kako bi se ispitala ponovljivost pripreme uzorka, svaki uzorak lijeka pripremljen je u šest paralelnih proba i analiziran (tablica 2). Relativna gustoća lijeka određena je prema Ph. Eur. metodi (Anon. 2008.).

Rasprava

Proces procjene mjerne nesigurnosti određivanja sadržaja florfenikola u otopinama za injekcije VMP-a HPLC metodom sastoji se od određivanja specifikacije mjerne veličine, prepoznavanja i analiziranja izvora mjerne nesigurnosti, kvantificiranja izvora mjerne nesigurnosti te računanja sastavljene i proširene mjerne nesigurnosti.

Specifikacija mjerne veličine je mg florfenikola / mL otopine prema jednadžbi (2), gdje je γ_0 masena koncentracija florfenikola izračunata iz kalibracijskog pravca, m_0 masa uzorka korištena u analizi, d gustoća i D faktor razrjeđenja.

$$S = \frac{\gamma_0 \times d \times D}{m_0} \quad (2)$$

Tablica 3 Nesigurnost kalibracijskog pravca

Parametar	Vrijednost
a	1999538,4
γ_m	0,3024
p	1
n	10
S_{xx}	0,2033
S	5712,1
$\bar{\gamma}_0$	0,3055

Tablica 4. Prikaz značajnih sastavnica mjerne nesigurnosti za otopine za injekcije

Izvor mjerne nesigurnosti	Vrijednost	Standardna nesigurnost	Vrsta procjene	Vjerojatnosna razdioba	Stupanj slobode	Relativna standardna nesigurnost
Odvaga standarda	0,0250 g	0,000065	B	normalna	∞	0,0026
Čistoća standarda	$\pm 0,5 \%$	0,0029	B	pravokutna	∞	0,0029
Odmjerna tikvica à 10 mL	$\pm 0,04$ mL	0,0231	B	normalna	∞	0,0023
Automatska pipeta à 1 mL	$\pm 0,001$ mL	0,001	B	normalna	∞	0,001
Kalibracijski pravac	0,3055 mg/mL	0,0009	A	normalna	14	0,0031
Točnost	98,5 %	0,2417	A	normalna	8	0,0025
Ponovljivost pripreme uzorka	295,82 mg/mL	1,3267	A	normalna	11	0,0045
Sastavljena mjerna nesigurnost (u_c)				2,2480		
Proširena mjerna nesigurnost (U)				4,4960		

Sastavnice mjerne nesigurnosti metode su: nesigurnost standarda, nesigurnost kalibracijskog pravca, nesigurnost pripreme uzorka i nesigurnost ponovljivosti mjerenja, a njihov izračun je prikazan u tablici 4. Čistoća standarda florfenikola, nesigurnost vage, nesigurnost odmjerne tikvice i pipete izvori su nesigurnosti tipa B čiji su podaci preuzeti iz umjernica i certifikata. Izvori nesigurnosti tipa A (ponovljivost mjerenja, ponovljivost pripreme uzorka i linearnost) su podaci dobiveni statističkom obradom rezultata validacijskih parametara.

Nesigurnost kalibracijskoga pravca (tablica 3.) izračunata je prema izrazu (3) gdje je $\bar{\gamma}_0$ srednja masena koncentracija florfenikola u otopinama uzor-

aka iz pokusa ponovljivosti izračunata iz kalibracijskoga pravca, γ_i masena koncentracija florfenikola u pojedinoj kalibracijskoj točki, S_{xx} suma kvadrata razlike γ_i i γ_m (gdje je γ_m medijan masene koncentracije), S rezidualno standardno odstupanje, a nagib pravca, p broj mjerenja na uzorku i n broj kalibracijskih točaka.

$$s_j = \frac{S}{a} \times \sqrt{\frac{1}{p} + \frac{1}{n} + \frac{(\bar{\gamma}_0 - \gamma_m)^2}{S_{xx}}} \quad (3)$$

$$S_{xx} = \sum (\gamma_i - \gamma_m)^2$$

Nesigurnost zbog ponovljivosti mjerenja i ponovljivosti pripreme uzorka izračunata je prema izrazu (4) gdje je $s(x)$ standardno odstupanje iz eksperimenta, a n broj mjerenja u nizu.

$$u_p = \frac{s(x)}{\sqrt{n}} \quad (4)$$

Sastavljena mjerna nesigurnost (u_c) je suma kvadrata relativnih standardnih nesigurnosti navedenih sastavnica, čiji se doprinos pojedinih sastavnica mjerne nesigurnosti prikazuje histogramom (slika 3.).

Proširena mjerna nesigurnost (U) metode određivanja sadržaja florfenikola u injekcijskim otopinama VMP-a računa se množenjem standardne nesigurnosti s obuhvatnim faktorom k , koji iznosi 2 (vjerojatnost 95%). U Laboratorijskim se izvješćima mjerni rezultat iskazuje srednjom razinom (S-razina) mjernog rezultata. Mjerna se nesigurnost prema međunarodnom dogovoru (Anon. 1995.a) iskazuje s dvije značajne znamenke, a mjerni se rezultat na S-razini zaokružuje na istoj mjernoj vrijednosti kao i mjerna nesigurnost metode.

Zaključak

Priprema standardnih otopina florfenikola i ponovljivost pripreme uzoraka daju najveći doprinos u mjernoj ne-

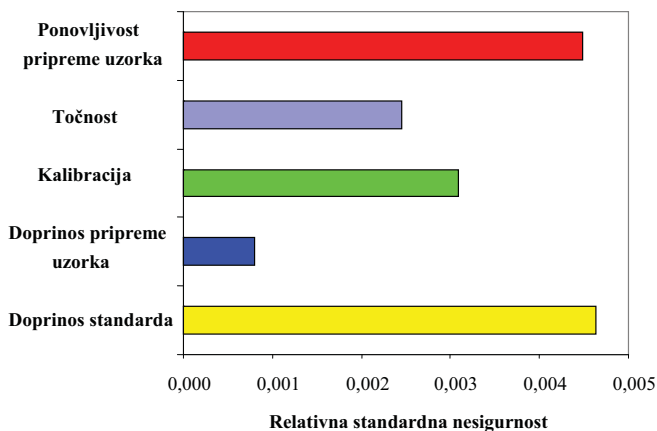
sigurnosti metode određivanja sadržaja florfenikola u injekcijskim otopinama VMP-a. Mjerna nesigurnost metode je 4,50 mg/mL, a rezultat analize sadržaja florfenikola u injekcijskim otopinama VMP-a iskazuje se na sljedeći način:

Sadržaj florfenikola = $(296,14 \pm 4,50)$ mg/mL, uz obuhvatni faktor $k=2$

Rezultat je analize sadržaja florfenikola prikazan u rasponu u kojem se s određenom vjerojatnošću nalazi prava vrijednost rezultata.

Sažetak

U radu je prikazan način procjene mjerne nesigurnosti rezultata analize sadržaja florfenikola u veterinarsko-medicinskim proizvodima (VMP), Floron® otopini za injekcije i Nuflor® otopini za injekcije, HPLC metodom vanjskog standarda. Eksperimentalni podaci dobiveni su u postupku validacije. Proces procjene mjerne nesigurnosti metode sastoji se od određivanja specifikacije mjerne veličine, prepoznavanja i analiziranja izvora mjerne nesigurnosti, kvantificiranja izvora mjerne nesigurnosti te računanja sastavljene



Slika 3. Grafički prikaz sastavnica mjerne nesigurnosti metode

i proširene mjerne nesigurnosti. Sastavnice mjerne nesigurnosti u metodi su: nesigurnost standarda, nesigurnost kalibracijskog pravca, nesigurnost pripreme uzorka i nesigurnost ponovljivosti mjerenja. Priprema standardnih otopina florfenikola i ponovljivost pripreme uzoraka daju najveći doprinos u mjernoj nesigurnosti metode određivanja sadržaja florfenikola u injekcijskim otopinama VMP-a. Rezultat analize sadržaja florfenikola u otopinama za injekcije je prikazan u rasponu u kojem se s određenom vjerojatnošću nalazi prava vrijednost rezultata.

Literatura

1. Anon. (1995a): Guide to the expression of uncertainty in measurement, 2nd Edition. ISO, Švicarska.
2. Anon. (1995b): Draft Guideline on Validation of Analytical Procedures: Definitions and Terminology. ICH, Švicarska.
3. Anon. (1998): The Fitness for Purpose of Analytical Methods – A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics. EURACHEM.
4. Dopuna popisa gotovih veterinarskih lijekova, ljekovitih dodataka i veterinarsko-medicinskih proizvoda odobrenih za stavljanje u promet. Ministarstvo poljoprivrede, šumarstva i vodnog gospodarstva, Narodne novine br. 119, 2007.
5. Dopuna popisa gotovih veterinarskih lijekova, ljekovitih dodataka i veterinarsko-medicinskih proizvoda odobrenih za uporabu. Ministarstvo poljoprivrede, šumarstva i vodnog gospodarstva, Narodne novine br. 63, 2006.
6. Anon. (2000): Quantifying Uncertainty in Analytical Measurement, 2nd Edition. EURACHEM/CITAC.
7. Anon. (2007): International vocabulary of basic and general terms in metrology. 3rd Edition. VIM, Švicarska.
8. Anon. (2008): Relative density (01/2008:20205). European Pharmacopoeia. 6th Edition, Aubin, Ligugé, Francuska.

Measurement uncertainty of the results of analysis of fluorphenicol contents in injection solutions

Ksenija ŠANDOR, B.Chem., Ph.D., Svjetlana TERZIĆ, DVM, Scientific Advisor, Miroslav ANDRIŠIĆ, DVM, Irena ŽARKOVIĆ, DVM, Croatian Veterinary Institute Zagreb

The paper presents a method of evaluation of measurement uncertainty of the results of analysis of fluorphenicol contents in veterinary medicine products (VMP), Floron® injection solution and Nuflor® injection solution by HPLC external standard method. Experimental data were obtained in a validation procedure. Evaluation of measurement uncertainty of the method consists of determination of measured property specifications, recognition and analysis of the sources of measurement uncertainty, quantification of sources of measurement uncertainty and calculation of combined and expanded measurement

uncertainty. Elements of measurement uncertainty in the method are: standard uncertainty, calibration line uncertainty, sample preparation uncertainty and measurement repeatability uncertainty. Preparation of standard solutions of fluorphenicol and repeatability of sample preparation provide maximum contribution to the measurement uncertainty of the method of determination of fluorphenicol contents in VMP injection solutions. Results of the analysis of fluorphenicol contents in the injection solutions are presented within a range including the actual value of the results with a certain probability.



PREDNISOLON ad us. vet.

injekcijska suspenzija

sustavni hormonski pripravak, kortikosteroid za sustavnu upotrebu, glukokortikoid, prednizolon

Sastav

1 mL injekcijske suspenzije Prednisolon ad us. vet. sadržava:

Prednizolon.....10 mg

Pomoćne tvari: benzilni alkohol, propilenglikol, makrogol 400, magnezij klorid heksahidrat, polisorbat 40 i voda za injekcije

Osnovna svojstva i djelovanje

Prednizolon je sintetski glukokortikoid (GK) srednje dugog djelovanja koji je po glukokortikoidnom učinku 4-5 x jači od kortizola. Potiče glukoneogenezu te posljedično povećava razinu glukoze u krvi i glikogena u jetri. Taj je učinak od posebne terapijske važnosti pri poremećajima mijene tvari (npr. ketoza). Osim navedenog, prednizolon indirektno koči aktivnost fosfolipaze A2, te posljedično umanjuje oslobađanje arahidonske kiseline iz staničnih membrana. Stoga je manje supstrata za stvaranje prostaglandina u ciklooksigenaznom putu i leukotriena u lipooksigenaznom putu.

Prednizolon koči upalnu reakciju, djeluje antiproliferativno, antialergijski i imunosupresijski. Antiflogistično i antialergijsko djelovanje temelji se na smanjivanju upalnih reakcija u tkivu, te kočenju degranulacije mastocita i oslobađanja medijatora upale (npr. histamina). Tijekom djelovanja GK stabiliziraju se biološke membrane, koči migracija leukocita, umanjuje propusnost krvnih žila i posljedična ekstrasvazacija, koči stvaranje veziva i ublažavaju znakovi vrućice i toksemije.

Indikacije

Najvažnije bolesti tj. patološka stanja kod kojih se prednizolon može upotrijebiti za potpuno i simptomatsko liječenje:

Nutritivni, metabolički i drugi poremećaji

Primarna ketoza krava, termičke i kemijske opekline, poticanje prohtjeva za hranom u stanjima opće iscrpljenosti, profilaksa puerperalne pareze (3-4 dana prije poroda) i znujski ugriz.

Upale mišićno-koštanog sustava

Neinfekcijske, traumatske i degenerativne upale - sterilni upalni procesi, aseptični artritis i poliartritis, intraartikularna primjena u slučajevima neinfekcijskog artritisa, burzitisa i tendovaginitisa, diskopatije, sakroilijska subluksacija, kraniocerebralne i spinalne ozljede.

Pretežno alergijska stanja

Pomoćno liječenje alergijskog dermatitisa i drugih nespecifičnih dermatoza, alimentarni egzantem, edemi alergijskog podrijetla i dr.

Način primjene i doze

Prednisolon ad us. vet. aplicira se i.m., s.c. ili intra-artikularno. Prije upotrebe bočicu treba dobro protresti.

Jednokratno se prednizolon i.m. ili s.c. aplicira konjima u dozi 0,5-1,0 mg/kg t.m., a govedima, psima i mačkama u dozi 0,2-0,5 mg/kg t.m.

Prednizolon se intraartikularno, ovisno o veličini zgloba, injicira konjima i govedima u dozi 5-250 mg/zglob, a psima i mačkama u dozi 5-20 mg/kg t.m. Doze iskazane u mL pripravka Prednisolon ad us. vet. dane su u tablici.

Vrsta životinje	Prednisolon ad us. vet.	
	i.m. ili s.c.	intra-artikularno
Konj	5-10 mL/100 kg	0,5-25 mL/zglob
Govedo	2-5 mL/100 kg	
Pas	0,2-0,5 mL/10 kg	0,5-2 mL/zglob
Mačka	0,1-0,25 mL/5 kg	

Prilikom intraartikularne primjene treba paziti da injicirana doza ne bude veća od maks. i.m. ili s.c. doze, a s obzirom na tjelesnu masu, Prednisolon ad us. vet. u pravilu se daje jednokratno. Ukoliko je terapiju potrebno ponoviti, pripravak se može aplicirati još jednom, 2-3 dana nakon prve injekcije.

Karencija

Meso i jestive iznutrice: Govedo.....18 dana
Konj.....6 mjeseci
Mlijeko krava.....1 dan

MRL status - prednizolon je razvrstan u Aneks I

Za konje, koje će se iskoristiti za prehranu ljudi, "vrijeme čekanja" za meso i jestive iznutrice iznosi 6 mjeseci (MRL nije određen). Podatak o liječenju treba upisati u svjedodžbu o zdravstvenom stanju životinje.

Pakiranje

100 mL

Proizvođač

AniMedica d.o.o. Senden-Bosensell, S.R. Njemačka

Zastupnik

CVA d.o.o., Zagreb, R. Hrvatska

Cijena

75,00 kn/100 mL

ANIMEDICA



CVA

Laboratorijska dijagnostika bjesnoće

Željko Čač, Ivana Lojkić, Tomislav Bedeković i Mirko Lojkić



Uvod

Premda slovi kao najstarija poznata zoonoza, bjesnoća je još i danas opće prisutan javno-zdravstveni problem u svjetskim razmjerima. Naime, prema izvješćima Svjetske zdravstvene organizacije (WHO), glede incidencije u ljudi, što ujedno znači i smrtnost, ta se zaraza nalazi na 10. mjestu među infektivnim bolestima. Diljem svijeta zbog nje na godinu umire od 25000 do 55000 ljudi i to gotovo isključivo u zemljama tropskog zemljopisnog pojasa (Zanoni i sur., 2000.). Budući da od 193 zemalja članica WHO-a bjesnoću prijavljuje samo njih oko 90, za pretpostaviti je da je pravo stanje još i gore, jer su službene brojke, osim u Europi i Americi, uvijek znatno manje od stvarnih. Takvo stanje ne iznenađuje ako se zna da u većini nerazvijenih zemalja, gdje uglavnom prevladava urbani oblik bjesnoće, tek svaka deseta osoba, izložena riziku, prima adekvatnu medicinsku zaštitu

od bjesnoće u smislu prije i poslije ekspozicijskog cijepljenja, a za ostale – sredstava nema (Baklaić, 2003.).

Uzročnik je bolesti virus koji kola unutar populacija vrlo prijemčivih vrsta divljih (lisica, vuk, kojot, šakal, kunopas, rakun, tvor, mungo, šišmiši krvosasi, kukcojedi i biljojedi) i domaćih životinja (pas). One u različitim dijelovima svijeta predstavljaju rezervoar virusa bjesnoće i stalan su izvor zaraze za druge životinje, a i čovjeka, kao posljednju kariku u tom smrtonosnom lancu.

Klasičan virus bjesnoće pripada porodici *Rhabdoviridae* i najznačajniji je predstavnik među sedam, do sada poznatih, serološki različitih genotipova unutar roda *Lyssavirus*. *Rabies virus* (genotip 1) uključuje sve klasične sojeve virusa bjesnoće, raširene diljem svijeta. Ostalih šest genotipova su virusu bjesnoće srodni virusi (*rabies-re-*

Dr. sc. Željko ČAČ, dr. vet. med., znanstveni suradnik, dr. sc. Ivana LOJKIĆ, znanstvena suradnica, Tomislav BEDEKOVIĆ, dr. vet. med., asistent, dr. sc. Mirko LOJKIĆ, dr. vet. med., redoviti profesor, Hrvatski veterinarski institut, Zagreb

lated viruses): *Lagos bat virus* (genotip 2), *Mokola virus* (genotip 3), *Duvenhage virus* (genotip 4), *European bat lyssavirus 1* (genotip 5), *European bat lyssavirus 2* (genotip 6) i *Australian bat lyssavirus* (genotip 7) (King i Crick, 1988., Schneider i Cox, 1994., Gould i sur., 1998., Bowen-Davies i Lowings, 2000., Davis i sur., 2005.). Svi genotipovi srodni virusu bjesnoće, osim *Lagos bat virusa*, uzrokuju bolest u čovjeka, koja se klinički ne razlikuje od bjesnoće uzrokovane klasičnim virusom (Smith, 1996.).

S obzirom da je riječ o bezuvjetno smrtonosnoj zoonози, dijagnostički postupak pri ovoj bolesti mora biti nadasve brz, točan i jednostavan. Pravodobna i pouzdana je dijagnoza bitan čimbenik u svekolikoj prevenciji, budući da život čovjeka često ovisi o vremenu proteklom od dodira s bijesnom životinjom do cijepljenja.

Prepoznavanje bjesnoće do Pasteurovog vremena zasnivalo se samo na kliničkoj slici zaraženih ljudi i životinja te na njihovim – najčešće netipičnim – razudbenim nalazima. Poražavajuća je činjenica da se u pojedinim dijelovima nerazvijenog svijeta (Africi, Aziji) još uvijek, u trećem tisućljeću, nerijetko samo na taj način dijagnosticira ta pogubna bolest.

Postavljanje dijagnoze bjesnoće u živih životinja – samo na osnovi anamnestičkih podataka i kliničkih znakova – upitno je pa prema tome i vrlo rizično. Čak i u slučajevima kada su izvanjski znakovi vidno izraženi, moguće je tek opravdano posumnjati na bolest. No, pri imalo nejasnim stanjima, nužan je veliki oprez. Naime, bijesni psi i mačke u slučaju izostanka faze pojačanog uzbuđenja i agresivnosti

(*tiha bjesnoća!*) lako mogu biti prosuđeni kao – nezaraženi, što redovito završava kobno po ugrizene ljude. Jednako tako, osobe ugrizene od životinja oboljelih od posve drugih bolesti praćenih živčanim simptomima, kao što su primjerice bolest Aujeszkoga, štenecak, bornanska bolest i toksoplazmoza u mačaka, bivaju nepotrebno podvrgnute postupku cijepljenja protiv bjesnoće. Zbog toga se kod svih uginulih ili usmrćenih klinički sumnjivih životinja dijagnoza obvezno mora potvrditi virološkim pretragama.

Kao i kod većine zaraznih bolesti, objektivna dijagnoza bjesnoće postavlja se na izravan i neizravan način isključivo u laboratorijskim uvjetima. U načelu, izravan dokaz temelji se na otkrivanju i prepoznavanju virusnog uzročnika, to jest njegovog antigena ili nukleinske kiseline u moždanom tkivu, slini ili likvoru. Neizravno se uzročnik bolesti potvrđuje nalazom specifičnih protutijela u krvnom serumu ili cerebrospinalnoj tekućini.

Začetnikom laboratorijske dijagnostike bjesnoće smatra se Zinke, koji je 1804. godine primijenio kuniće kao prve pokusne životinje u svrhu dokazivanja bolesti. No, gotovo tromjesečna inkubacija u kunića, kojima je slina klinički sumnjivih životinja bivala utrljana u skarificiranu kožu, činila je taj postupak, glede ugrizena čovjeka, dijagnostički bezvrijednim. Metodu je 1881. godine unaprijedio Pasteur nanoseći zarazni materijal izravno na površinu mozga trepaniranih kunića, skrativši time inkubaciju na najviše 14 dana, a uginuće na tri tjedna (cit. Karlović i Lojkić, 1987.).

Rutinska se dijagnostika bjesnoće do danas postupno usavršavala i uglavnom počiva na trima metodama: patohistološkoj pretrazi mozga s nalazom Negrijevih tjelešaca, dokazu virusa naciepljivanjem miševa ili stanične kulture te na otkrivanju virusnog antigena tehnikom imunofluorescencije.

Suvremena uporaba monoklonskih protutijela i enzimskih konjugata u imunoenzimnim testovima (ELISA) te primjena oligonukleotidnih početnica u metodi lančane reakcije polimerazom (PCR) višestruko je povećala osjetljivost i specifičnost tih postupaka pri otkrivanju virusa bjesnoće, kao i u dokazivanju njegova antigena ili nukleinske kiseline. Ipak, ponajprije zbog složenosti izvedbe i razmjerne skupoće, ti sofisticirani testovi nisu uvedeni u rutinsku dijagnostiku bjesnoće. Za sada oni služe za gensku tipizaciju lisavirusa te za razlikovanje mnogobrojnih sojeva klasičnog virusa bjesnoće s obzirom na životinjsku vrstu iz koje su izdvojeni i na geografsko podrijetlo tih životinja.

Serološke su pretrage, prije svega zbog primjene imunofluorescencije kao „zlatnog standarda“ u laboratorijskoj dijagnostici bjesnoće, također izgubile na svojoj važnosti u etiološkoj dijagnostici. Danas se one uglavnom rabe za provjeru imunog stanja ljudi i životinja nakon cijepljenja. Za kućne ljubimce, pse i mačke, provjera imuniteta je obvezatna prije njihova unosa u zemlje slobodne od bjesnoće, budući da strogi propisi tih zemalja ne priznaju potvrdu samo o cijepljenju. U europskim se pak državama, koje provode oralnu imunizaciju lisica protiv bjesnoće, serološkim postupcima istražuje nji-

hov imuni odziv u svrhu procjene uspješnosti takvih programa iskorjenjivanja bjesnoće. Od seroloških postupaka rabe se tri međunarodno priznata testa: virus-neutralizacijski imunofluorescentni test (FAVN test), brzi test inhibicije fluorescentnih žarišta (RFFIT) i imunoenzimni test (ELISA).

Ostali postupci kao npr. serum-neutralizacijski test na miševima (MNT), agar-gel imunodifuzija (AGID), reakcija vezanja komplementa (RVK), inhibicija hemaglutinacije (IHA) i radioimunološki test (RIA) u serološkoj dijagnostici bjesnoće primjenjuju se znatno rjeđe.

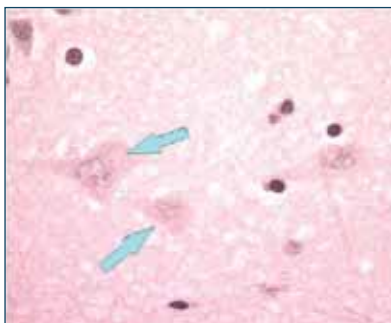
A) Etiološka dijagnostika bjesnoće

Patohistološka pretraga

Veliki iskorak u dijagnostici bjesnoće načinio je početkom prošlog stoljeća talijanski patolog A. Negri podrobno opisavši specifične, eozinofilne, intracitoplazmatske uklopine u velikim ganglijskim stanicama mozgov bjesnih životinja (Negri, 1903.), a koje su ubrzo, njemu u čast, nazvane njegovim imenom. Negrijeva tjelešca mogu se dokazati posebice u piramidnim stanicama Ammonovih rogova te u Purkinjevim stanicama malog mozga.

Prednosti histološke pretrage su brza i jednostavna provedba u vremenu od tek nekoliko sati, a njezin glavni nedostatak je upitna pouzdanost koja se kreće od 90-96% kod pasa te 78-83% kod ostalih vrsta domaćih životinja (Schaff, 1941., cit. u Man-

ninger, 1959.). Uklopine se u neuronima počinju stvarati tek neposredno prije uginuća pa se u početnom stadiju bolesti, kod prijevremeno utamanjenih životinja, većinom ne mogu dokazati. Zato stoji činjenica da dokaz Negrijevih tjelešaca u moždanom tkivu potvrđuje dijagnozu bjesnoće, ali je negativan nalaz ne isključuje.



Slika 1. Pozitivan patohistološki nalaz na bjesnoću; Negrijeva tjelešca u piramidnim stanicama Ammonovih rogova

Unatoč nedostatnoj vjerodostojnosti dobivenih nalaza, histološka se pretraga održala u dijagnostičkim laboratorijima, kao jedina brza metoda, više od pet desetljeća. Ipak, razvojem specifičnijih i osjetljivijih testova, ona danas u rutinskoj dijagnostici bjesnoće ima tek povijesno značenje.

Biološki pokus

Ucjepljivanjem zarazne sline izravno u mozak mišjoj sisančadi moguće je dokazati virus bjesnoće u oboljelih ljudi i životinja još za njihova života pa čak i prije pojave kliničkih simptoma bolesti. Nakon smrti, u istu svrhu rabi se 20%-tna suspenzija mozga umrlih osoba, ili ubijenih ili uginulih životinja (Koprowski, 1973.), a količina inokuluma iznosi 0.03 ml. S obzirom na to da

dio miševa može preživjeti infekciju u pokus se stavlja najmanje šest miševa. U slučaju pozitivna nalaza miševi ugibaju između 5. i 25. dana poslije infekcije (p.i.), a uginuća se unutar prva četiri dana smatraju nespecifičnim.

Konačna se dijagnoza bjesnoće ne može postaviti samo na osnovi kliničkih simptoma ili uginuća pokusnih miševa, već se mora obvezatno potkrijepiti pretragom njihovih mozgova s ciljem dokazivanja virusnog antigena pomoću izravne imunofluorescencije (Goldwasser i Kissling, 1958.) ili izdvajanja virusa u kulturi stanica.

Dijagnostički postupak može se skratiti žrtvovanjem miševa iz usporedne pokusne skupine 4. i 7. dan p.i., uz istovjetnu primjenu imunofluorescencije ili postupka izdvajanja virusa (Kaplan 1966.).

Prema naputku Svjetske zdravstvene organizacije iz 1980. godine, biološki se pokus morao primijeniti pri svim dvojbenim imunofluorescentnim nalazima, kao i u slučajevima kada je klinički sumnjiva životinja ozlijedila čovjeka, a u koje je metodom imunofluorescencije dobiven negativan rezultat.

Tijekom pojave i širenja silvatične bjesnoće u Hrvatskoj, prije tridesetak godina, biološki pokus je služio i kao potpora imunofluorescenciji u slučaju pojave bjesnoće na nekom novom području ili pri prvom dokazu bolesti u pojedinim životinjskih vrsta.

Pouzdanost biološkog pokusa je gotovo apsolutna i procjenjuje se na oko 99% (Kaplan, 1966.). No, vrijeme trajanja pokusa od čak 28 dana, potrebno za konačnu prosudbu rezultata pretrage, ograničava njegovu praktičnu vrijednost u rutinskoj dijagnostici bjesnoće.

Osim toga, uporaba pokusnih miševa u tu je svrhu, iz osnova zaštite životinja, u novije vrijeme potpuno napuštena, te zamijenjena jednako vrijednim postupkom izdvajanja i dokazivanja virusa u kulturi stanica. Zato se danas biološki pokus u svezi bjesnoće uglavnom još primjenjuje samo pri temeljito opravdanim znanstvenim istraživanjima.

Izdvajanje virusa u kulturi stanica

Objektivna dijagnoza bjesnoće može se, razmjerno brzo, postaviti umnažanjem virusa u odgovarajućoj kulturi stanica neposrednim naciepljivanjem sline, cerebrospinalne tekućine ili suspenzije moždanog tkiva zaraženih ljudi i životinja.

Za izvođenje se testa rabi linijska kultura stanica mišjih neuroblastoma, budući da su te stanice najosjetljivije na infekciju terenskim sojevima virusa bjesnoće (Bourthy i sur., 1989.). Konačno prepoznavanje virusa postiže se pretraživanjem inficirane stanične kulture imunofluorescentnom tehnikom.

Postupak je u prvom redu namijenjen potvrđivanju nalaza dobivenih otkrivanjem virusnog antigena pomoću izravne imunofluorescencije te za daljnje istraživanje bitnih značajki izdvojenih sojeva virusa.

Tim se postupkom moraju pretražiti sve životinje u kojih je imunofluorescencijom dobiven upitan ili negativan nalaz, a klinička slika i anamnestički podaci upućuju na moguću bjesnoću. Poglavitno je to nužno učiniti u slučajevima dodira ljudi s takovim životinjama (WHO, 1980.).

U odnosu na klasičan biološki pokus, metoda izdvajanja virusa u staničnoj kulturi ima niz znatnih prednosti: skraćuje vrijeme dijagnoze na najviše tri dana, ne zahtijeva uporabu pokusnih životinja i znatno je jeftinija za izvođenje. Činjenica da je ovaj test jednako osjetljiv, a ponekad i osjetljiviji od biološkog pokusa (Rudd i sur., 1980.), presudan je razlog što je kultura stanica u novije vrijeme posve zamijenila pokusne miševe u laboratorijskoj dijagnostici bjesnoće.

Imunofluorescentni test

Imunofluorescentni test (IFT), test fluorescentnih protutijela (FAT = fluorescent antibody test) ili uobičajeno i kraće - imunofluorescencija (IF) je serološka metoda koja je u dijagnostiku bjesnoće uvedena sredinom prošlog stoljeća (Goldwasser i Kissling, 1958.), a još i danas predstavlja izborni postupak u rutinskoj dijagnostici bjesnoće u svim referentnim laboratorijima diljem svijeta.

Metoda je svojevrsna i veoma osjetljiva te objedinjuje točnost biološkog pokusa i brzinu patohistološke pretrage. Pomoću nje moguće je dobiti pouzdanu dijagnozu već u roku od 2-3 sata nakon dostave dijagnostičkog



Slika 2. Imunofluorescentni test; mikroskopsko pretraživanje preparata moždanog tkiva na bjesnoću

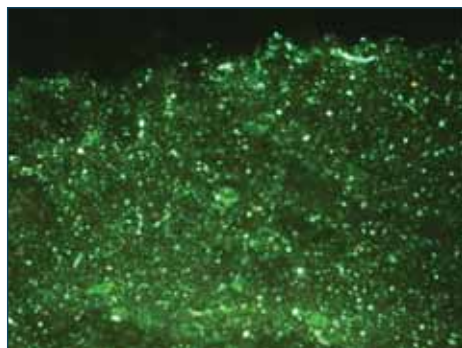
materijala u laboratorij. Prednost ove metode je i što se virusni antigen može dokazati čak i u djelomice raspadnutom uzorku tkiva.

Test se zasniva na mikroskopskoj pretrazi otisnutih preparata, razmaza ili smrznutih rezova moždanog tkiva, prethodno obrađenih sa specifičnim gamaglobulinom obilježenim fluorescentnom bojom. Kao antigen za pripremanje gamaglobulina služi virusni nukleoprotein s kojim se postiže izuzetno visoka specifičnost i dobar titar, a za bojenje se rabi fluorescein-izotiocianat (FITC) (Bourthy i sur., 1989.). Na taj su način pripravljeni, stručno nazvani *konjugati*, komercijalno dostupni od raznih proizvođača.

U pozitivnom se slučaju FITC-om obilježena serumska protutijela nepovratno vežu na virusni antigen u istraživanom tkivu, a nalaz se očituje u vidu jasno ograničenih, okruglih ili ovalnih, manjih ili većih tvorbi koje pod ultraljubičastim svjetlom mikroskopa fluoresciraju zelenom bojom. Riječ je o brojnim nakupinama antigenskih čestica koje zbog svoje sićušnosti nisu histološki prepoznatljive kao Negrijeva tjelešca.

Na ovaj se način isto tako mogu pretraživati kulture stanica i tkiva pokusnih životinja nakon infekcije virusom bjesnoće, a specifična monoklonska protutijela, primijenjena u ovoj tehnici, doprinijela su jednostavnijoj i bržoj genetskoj tipizaciji novo izdvojenih terenskih sojeva.

Metoda izravne imunofluorescencije rabi se, kao neprijeporan dijagnostički postupak, u virološkim laboratorijima Hrvatskog veterinarskog instituta od 1976. godine i njome je u protekle 33 go-



Slika 3. Imunofluorescentni test; mikroskopska slika pozitivna nalaza na bjesnoću – moždano tkivo javavca

dine na bjesnoću pretraženo više od 96 000 različitih divljih i domaćih životinja.

Kornealni test

Kornealni je test (CT = cornea test) u laboratorijsku dijagnostiku bjesnoće uveo Schneider 1969. godine. Njime se pomoću izravne imunofluorescencije dokazuje prisutnost virusa u epitelnim stanicama rožnice već prvih dana bolesti, štoviše i prije pojave kliničkih znakova u bolesnika (Koch i sur., 1975.) te prirodno ili pokusno zaraženih životinja. Virus bjesnoće u rožnici ostaje trajno i može se otkriti u svim stadijima bolesti.

Pacijentu s encefalitičnim simptomima otisak se s rožnice uzima laganim dodiranjem predmetnog stakalca na njezin središnji dio. Nakon fiksiranja preparata, virusni se antigen otkriva uobičajenim postupkom izravne imunofluorescencije i dijagnoza se postiže već u roku od nekoliko sati. Pozitivan rezultat ovog testa potvrđuje bjesnoću, ali je ni negativan nalaz ne isključuje.

Imunofluorescentnim se testom mogu pretražiti i uzorci kože ljudi sumnjivih na zarazu (WHO, 1992.).

Koža se uzima s nuhalnog područja vrata zajedno s dlačnim folikulima koji sadržavaju periferne živce, a virus se bjesnoće u tom tkivu može dokazati već u najranijoj fazi bolesti. Tim se postupkom, pomoću kojeg je moguće razlučiti razne kliničke encefalitise pozitivni rezultati na početku bolesti mogu dobiti samo kod manjeg broja pacijenata. Napredovanjem bolesti povećava se broj pozitivnih nalaza, a u završnom stadiju virus ponovo može nedostajati u biopsiranom tkivu.

Ukupna osjetljivost testa veća je u uzorcima kože nego li u kornealnim otiscima, ali je za ishod pretrage u oba slučaja od presudnog značaja kakvoća uzetih uzoraka (WHO, 1992.).

Lančana reakcija polimerazom

Napredak molekularne biologije i nove spoznaje o strukturi virusnih proteina i sastavu nukleinske kiseline virusa bjesnoće, zajedno s razvojem sofisticiranih dijagnostičkih sredstava, pridonijeli su izradi osjetljivijih, specifičnijih i bržih testova u dijagnostici bjesnoće. Jedan od njih je test lančane reakcije polimerazom (PCR = polymerase chain reaction) za brzo otkrivanje svih sedam, do danas poznatih, genotipova virusa bjesnoće (Whitby i sur., 1997., Kulonen i sur., 1999.).

U načelu, tipizaciju lisavirusa kao i razlikovanje sojeva klasičnog virusa bjesnoće omogućila je uporaba specifičnih oligonukleotidnih početnica za svaki pojedini genotip virusa bjesnoće te određivanje nukleotidnog slijeda (sekvenciranje) pojedinih odsječaka genoma, praćenih filogenetskom analizom. Cijeli postupak

od izdvajanja virusne ribonukleinske kiseline (RNK) do RT-PCR (= Reverse Transcription PCR) traje oko 6 sati i osjetljiviji je od testa imunofluorescencije u slučajevima kada je moždano tkivo u raspadnutom stanju.

Radi što bržeg otkrivanja virusa sve se više primjenjuje tzv. RT-PCR u stvarnom vremenu (= real-time RT-PCR) koji ne zahtijeva uporabu elektroforeze nakon završetka testa, čime se bitno skraćuje vrijeme njegove provedbe.

At-cPCR (= air thermo-cycler PCR) je najbrži postupak pomoću kojeg je već unutar pet sati moguće s apsolutnom sigurnošću prepoznati sojeve klasičnog virusa bjesnoće i njemu srodne lisaviruse (Heaton i sur., 1999.).

PCR-ELISA u obliku gotovih kitova suvremeni je test za otkrivanje svih genotipova virusa bjesnoće u mozgu, slini i cerebrospinalnoj tekućini ljudi i životinja te u kulturi stanica i tkivima pokusnih životinja.

Imunoenzimni test

Imunoenzimni je test (ELISA = enzyme-linked immunosorbent assay) također jednostavan, brz, osjetljiv i specifičan postupak za otkrivanje nukleokapsidnog antigena virusa bjesnoće u moždanom tkivu, slini i likvoru oboljelih ljudi i životinja. Uporabom gotovih, komercijalno dostupnih kitova, ovim se testom može dokazati virus i u inficiranim kulturama stanica te tkivima pokusno zaraženih životinja. Tehnika je nadasve korisna u svrhu epidemiološkog prosuđivanja bjesnoće (WHO, 1992.).

S ELISA testom poznatim i kao *brza enzimna imunodijagnoza bjesnoće* (RREID

= rapid rabies enzyme immunodiagnosis) moguće je virusni antigen učiniti vidljivim golim okom pa se pomoću specijalnih kitova pretraga na bjesnoću može obaviti i u terenskim uvjetima (Perrin i sur., 1992.). Testom se mogu pretraživati i djelomično autolitični uzorci tkiva, ali ne i uzorci prethodno konzervirani u formalinu (WHO, 1992.).

Posljednjih godina razvijen je novi kvantitativni postupak za otkrivanje virusa bjesnoće pomoću ovog testa. Metoda nazvana N-ELISA temelji se na određivanju količine viriona, prihvaćenih u jažicama mikropločice, pomoću specifičnih poliklonskih protutijela virusa bjesnoće (Katayama i sur., 1999.).

B) Serološka dijagnostika bjesnoće

Virus-neutralizacijski imunofluorescentni test

Virus-neutralizacijski imunofluorescentni test (FAVN test = fluorescent antibody virus neutralization test) je fluorescentni serološki postupak koji je Međunarodni ured za epizootije (O.I.E.) predložio za dokazivanje neutralizacijskih protutijela u krvnim serumima pasa, mačaka i lisica cijepljenih protiv bjesnoće (Aubert i sur., 1996., Cliquet i sur., 1998.).

Postupak virusne neutralizacije izvodi se u kulturi stanica bubrega hrčka (BHK-21) u mikrotitarskim pločicama, a neutralizacijski učinak protutijela vidljivim se učini uobičajenom tehnikom imunofluorescencije.

U testu se rabe soj virusa bjesnoće CVS 11 (Challenge Virus Standard), kontrolni pozitivni serum (O.I.E.-Standard), kontrolni negativni serum i standardni

IF-konjugat (FITC anti-rabies monoclonal globulin). Sam postupak traje dva dana, a konačna visina titrova protutijela u ispitujućim se serumima uspoređuje s titrom dobivenim u kontrolnom serumu (Cliquet i sur., 1998.). Vrijednost titrova jednaka ili viša od 0.5 I.U./ml je međunarodno prihvaćena kao pokazatelj uspješnosti imunizacije. Naime, to je najniži titar koji zaštićuje životinje od pokusne infekcije, s obzirom na to da u cijepljenih pasa i mačaka s titrovima višim od 0.5 I.U./ml nisu utvrđeni klinički slučajevi bjesnoće (Aubert, 1993.).

Osim u istraživanjima imunitetnog stanja lisiče populacije u okviru kampanja oralnog cijepljenja protiv bjesnoće (Pastoret i Brochier, 1998.) FAVN test nalazi primjenu i u neizostavnoj kontroli imuniteta profilaktički cijepljenih pasa i mačaka sa svrhom izdavanja uredovnih potvrda za njihov nesmetani unos u bjesnoćom nezaražena područja, kao što su primjerice sve skandinavske zemlje, Velika Britanija, Australija, Novi Zeland i dr. (WHO, 1992.).



Slika 4. Serološka dijagnostika bjesnoće; virus neutralizacijski imunofluorescentni test

Brzi test inhibicije fluorescentnih žarišta

Brzi test inhibicije fluorescentnih žarišta (RFFIT = rapid fluorescent fo-

cus inhibition test) je isto fluorescentni serološki postupak za dokazivanje neutralizacijskih protutijela virusa bjesnoće i jedan je od testova izbora u rutinskoj serologiji (Smith i sur., 1973.).

Prema preporuci Svjetske zdravstvene organizacije ovim se visoko specifičnim i osjetljivim testom provjerava imuni odgovor osoba cijepljenih protiv bjesnoće inaktiviranim cjepivima proizvedenim u kulturi stanica. Stručnjaci WHO-a ujedno predlažu da se serum-neutralizacijski test na miševima (MNT = mouse serum neutralization test) pri mjerenju razine protutijela u krvnom serumu ili likvoru necijepljenih pacijenata zamijeni s RFFIT-om, budući da je on brži i jednako osjetljiv kao i MNT (WHO, 1992.). Međunarodni ured za epizootije pak zagovara RFFIT za prosudbu imuniteta oralno cijepljenih lisica, dok za serološko pretraživanje profilaktički imuniziranih pasa i mačaka ovaj postupak nije međunarodno prihvaćen.

Načelo testa ogleda se u sposobnosti serumskih protutijela da spriječe infekciju stanica referentnim sojem virusa bjesnoće (CVS 11) te u završnom prepoznavanju tog učinka tehnikom izravne imunofluorescencije pomoću standardnog IF-konjugata. Pritom se u logaritamski razrijeđenim ispitujućim serumima utvrđuju titrovi neutralizacijskih protutijela i zatim uspoređuju s titrom kontrolnog pozitivnog seruma (Sureau i sur., 1982.).

U suštini, glede osnovnih ingrediencija pa i samog načina izvođenja postupka, RFFIT je veoma nalik FAVN testu. Razlikuju se samo po tome što se kod RFFIT-a primjenjuje novi klon

stanične kulture (BSR Cl13) i drugačiji kontrolni pozitivni serum (WHO-Standard) te što se u završnom dijelu postupka, poradi lakšeg očitavanja rezultata, uobičajene mikrotitarske plitice zamjenjuju manjim tzv. Terasaki pliticama. Najniža vrijednost titra neutralizacijskih protutijela, koja jamči zadovoljavajuću imunost, i pri ovom je testu 0.5 I.U./ml (WHO, 1992.).

Imunoenzimni test

Imunoenzimni testovi (ELISA), namijenjeni određivanju razine neutralizacijskih protutijela za virus bjesnoće u krvnom serumu ili plazmi pomoću pročišćenog virusnog glikoproteina, za sada su u uporabi pretežito u humanoj medicini. Doduše, usavršenim ELISA testnim sustavima, temeljenim na stafilokoknom (*Staphylococcus aureus*) proteinu A, mogu se na prisutnost protutijela za glikoprotein virusa bjesnoće u serumu, osim ljudi, pretraživati i pojedine životinjske vrste (pas, mačka, miš, zamorče, kunić, majmun). No, većina od bjesnoće slobodnih zemalja (Švedska, Norveška, Finska, Velika Britanija, Australija, Novi Zeland) ne priznaje ovaj postupak kao referentnu metodu za ocjenu imunitetnog stanja pasa i mačaka zaštitno cijepljenih protiv bjesnoće.

Ni za potrebe epidemioloških istraživanja kod divljih životinja, u smislu pratećih pretraga pri oralnoj imunizaciji lisica, ne postoje još primjereni ELISA testovi. Uporaba komercijalno dostupnih testova za tu namjenu iziskuje ponajprije jednu iscrpnu validaciju testnog sustava.

Prednosti imunoenzimne metode su što se u razmjerno kratkom vremenu

(3-4 sata) može pretražiti veliki broj serum, što se u testu ne rabi živi virus te što se primjenom specijalnih komercijalnih kitova test može provesti i u terenskim uvjetima (Sureau i sur., 1982.).

Uporaba ELISA testa preporučuje se i u slučajevima sumnjivih nalaza dobivenih virus-neutralizacijskim testovima. Ipak, u odnosu na FAVN test i RFFIT, ELISA je manje osjetljiva metoda jer se u mjerenja, osim protutijela virusa bjesnoće, ponekad uključuju i razna druga protutijela, a i moguća bakterijska zagađenja mogu negativno utjecati na vjerodostojnost rezultata pretrage.

Sažetak

Dijagnostika bjesnoće, s obzirom na značaj te bolesti, od koje prema statistikama Svjetske zdravstvene organizacije na godinu umire do 55000 ljudi, mora biti nadasve brza, točna i pouzdana.

U rutinskoj laboratorijskoj dijagnostici, za dokaz virusnog antigena, izborni postupak je tehnika fluorescentnih antitijela (FAT ili imunofluorescencija). Patohistološka pretraga moždanog tkiva na prisutnost Negrijevih tjelešaca već je odavno napuštena i danas ima tek povijesno značenje, a biološki pokus na miševima zamijenjen je jednako vrijednim postupkom izdvajanja virusa u kulturama stanica neposrednim naciepljivanjem sline, cerebrospinalne tekućine ili suspenzije moždanog tkiva zaraženih ljudi i životinja.

Objektivna dijagnoza može se vrlo brzo postaviti i pomoću imunoenzimnih testova (ELISA) te lančanom

reakcijom polimerazom (PCR). Potonja metoda, unatoč svoje velike osjetljivosti i specifičnosti u otkrivanju virusa bjesnoće te u dokazivanju njegova antigena ili nukleinske kiseline, ponajprije zbog složenosti izvedbe i razmjerne skupoće, nije uvedena u rutinsku dijagnostiku bjesnoće. Za sada ona služi za gensku tipizaciju lisavirusa te za razlikovanje mnogobrojnih sojeva klasičnog virusa bjesnoće.

U serološkoj dijagnostici rabe se tri standardizirane metode: imunoenzimni test (ELISA), virus-neutralizacijski imunofluorescentni test (FAVN-test) i brzi test inhibicije fluorescentnih žarišta (RFFIT). Njima se, dokazom specifičnih protutijela u krvnim serumima, provjerava imuni odaziv ljudi i životinja nakon cijepljenja protiv bjesnoće.

Literatura

1. AUBERT, M. F. A. (1993): Can vaccination validated by the titration of rabies antibodies in serum of cats and dogs be an alternative to quarantine measures? Bureau Hygiene Top. Dis. 68, 2-22.
2. AUBERT, M. F. A., F. CLIQUET and J. BARRAT (1996): Rabies. OIE Manual of Standards for Diagnostic Tests and Vaccines, 3rd edn. Office Internat. Epizoot., Paris, 207.
3. BAKLAIĆ, Ž. (2003): Bjesnoća (rabies). Epidemiologija zaraznih bolesti. Medicinska naklada, Zagreb.
4. BOURTHY, H., P. E. ROLLIN, J. VINCENT and P. SUREAU (1989): Comparative Field Evaluation of the Fluorescent-Antibody Test, Virus Isolation from Tissue Culture, and Enzyme Immunodiagnosis for Rapid Laboratory Diagnosis of Rabies. J. Clin. Microbiol. 27, 519-523.
5. BOWEN-DAVIES, JENNY and P. LOWINGS (2000): Current perspectives on

- rabies. 1. The biology of rabies and rabies-related viruses. In Practice 22, 118-124.
6. CLIQUET, F., M. F. A. AUBERT and L. SAGNÉ (1998): Development of a fluorescent antibody virus neutralisation test (FAVN test) for the quantitation of rabies-neutralising antibody. J. Immunol. Methods 212, 79-87.
7. DAVIS, P. L., E. C. HOLMES, F. LARROUS, W. H. M. VAN DER POEL, K. TJORNEHOJ, W. J. ALONSO and H. BOURTHY (2005): Phylogeography, population dynamics and molecular evolution of european bat lyssaviruses. J. Virol. 79, 10487-10497.
8. GOLDWASSER, R. A. and R. E. KISSLING (1958): Fluorescent Antibody Staining of Street and Fixed Virus Antigens. Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 98, 219-223.
9. GOULD, A. R., A. D. HYATT, R. LUNT, J. A. KATTENBELT, S. HENGSTBERGER and S. D. BLACKSELL (1998): Characterization of a novel lyssavirus isolated from Pteropid bats in Australia. Virus Res. 54, 165-187.
10. HEATON, P. R., LORRAINE M. McELHINNEY and P. LOWINGS (1999): Detection and identification of rabies and rabies-related viruses using rapid-cycle PCR. J. Virol. Methods 81, 63-69.
11. KAPLAN, M. M. (1966): The laboratory in the diagnosis and prevention of rabies. WHO Monogr. Ser. 23, 11-16.
12. KARLOVIĆ, M. i M. LOJKIĆ (1987): Dijagnostika bjesnoće od Pasteura do danas. Vet. stanica 18, 151-156.
13. KATAYAMA, Sh., M. YAMANAKA, S. OTA and Y. SHIMIZU (1999): A new quantitative method for rabies virus by detection of nucleoprotein in virion using ELISA. J. Vet. Med. Sci. 61, 411-416.
14. KING, A. A. and J. CRICK (1988): Rabies-related viruses. In: CAMPBELL, J. B. and K. M. CHARLTON (Eds.): Rabies. Kluwer Academic Publishers, Boston, 177-199.
15. KOCH, F. J., J. W. SAGARTZ, D. E. DAVIDSON and K. LAWHASWASDI (1975): Diagnosis of human rabies by the cornea test. Am. J. Clin. Pathol. 63, 509-515.
16. KOPROWSKI, H. (1973): The mouse inoculation test. WHO Monogr. Ser. 23, 85-93.
17. KULONEN, K., M. FEKADU, S. WHITFIELD and C. K. WARNER (1999): An Evaluation of Immunofluorescence and PCR Methods for Detection of Rabies in Archival Carnoy-Fixed, Paraffin-Embedded Brain Tissue. J. Vet. Med. B 46, 151-155.
18. MANNINGER, R. (1959): Spezielle Pathologie und Therapie der Haustiere, Infektionskrankheiten, Wutkrankheiten. Lyssa. WEB Gustav Fischer Verlag, Jena, 637-668.
19. NEGRI, A. (1903): Beitrag zum Studium der Aetiologie der Tollwut. Ztschr. Hyg. Infektionskr. 43, 507-528.
20. PASTORET, P.-P. and B. BROCHIER (1998): Epidemiology and Elimination of Rabies in Western Europe. Vet. J. 156, 83-90.
21. PERRIN, P., C. GONTIER, E. LECOCQ and H. BOURTHY (1992): A modified rapid enzyme immunoassay for the detection of rabies and rabies-related viruses: RREID-lyssa. Biological 20, 51-58.
22. RUDD, R. J., CH. V. TRIMARCHI and M. K. ABELSETH (1980): Tissue Culture Technique for Routine Isolation of Street Strain Rabies Virus. J. Clin. Microbiol. 12, 590-593.
23. SCHNEIDER, L. G. (1969): The cornea test; a new method for the intra-vitam diagnosis of rabies. Zbl. Vet. Med. B. 16, 24-31.
24. SCHNEIDER, L. G. and J. H. COX (1994): Bat lyssaviruses in Europe. In: RUPPRECHT, C. E., B. DIETZSCHOLD, H. KOPROWSKI (Eds.), Lyssaviruses. Springer-Verlag, Berlin, 207-218.
25. SMITH, J. S., P. A. YAGER and G. M. BAER (1973): A rapid reproducible test for determining rabies neutralizing antibody. Bull. WHO 48, 535-541.

26. SMITH, J. S. (1996): New aspects of rabies with emphasis on epidemiology, diagnosis, and prevention of the disease in the United States. *J. Clin. Microbiol. Rev.* 9, 166-176.
27. SUREAU, P., P. E. ROLLIN and H. ZELLER (1982): Corrélations entre l'épreuve immunoenzymatique, la séro-neutralisation et la réduction de foyers fluorescents pour le titrage des anticorps rabiques. *Comp. Immun. Microbiol. infect. Dis.* 5, 143-150.
28. WHITBY, J. E., P. R. HEATON, H. E. WHITBY, E. O'SULLIVAN and P. JOHNSTONE (1997): Rapid detection of rabies and rabies-related viruses by RT-PCR and emzymelinked immunosorbent assay. *J. Virol. Methods* 69, 63-72.
29. WHO (1980): Rabies. Report of WHO consultation on rabies prevention and control 188, 1-43. World Health Organization, Geneva.
30. WHO (1992): Expert Committee on Rabies, Geneva. Technical Report Series No. 824, 7-10.
31. ZANONI, R. G., A. KAPPELER, U. M. MÜLLER, Ch. MÜLLER, A. I. WANDELER and U. BREITENMOSE (2000): Tollwutfreiheit der Schweiz nach 30 Jahren Fuchstollwut. *Schweiz. Arch. Tierheilk.* 142, 423-429.

Laboratory diagnosis of rabies

Željko ČAČ, DVM, Ph.D., Scientific Associate, Ivana LOJKIĆ, Ph.D., Scientific Associate, Tomislav BEDEKOVIĆ, DVM, Assistant, Mirko LOJKIĆ, DVM, Ph.D., Full Professor, Croatian Veterinary Institute, Zagreb

Regarding the importance of the disease, rabies diagnosis must be rapid, specific and accurate. According to the WHO data, 55000 people are dying from rabies every year.

In routine laboratory diagnosis of rabies infection, fluorescent antibody technique (FAT) is a method of choice. Pathohistological detection of the Negri bodies in brain tissue has only a historical importance today. Biological experiments on mice have been replaced with virus isolation in cell culture from saliva, cerebrospinal fluid or brain tissue suspension of infected humans and animals.

Objective diagnosis could be obtained rapidly using immunoenzyme

methods (ELISA) and polymerase chain reaction (PCR). Regardless of accuracy and specificity, PCR method is not included in routine diagnosis of rabies, but it is necessary for molecular characterization of Lyssaviruses and rabies virus strain differentiation.

Three standardized methods are applied in serology: ELISA, fluorescent antibody virus neutralization test (FAVN) and rapid fluorescence focus inhibition test (RFFIT). Those tests serve for control of immune status after anti rabies vaccination of humans and animals.

Razine nitrita i polifosfata u proizvodima od mesa

Jelka Pleadin, Nina Perši i Jelena Đugum



Uvod

Primjena novih tehnologija i sve većeg broja različitih dodataka pri proizvodnji hrane s ciljem produljenja njezine trajnosti, povećanja raznolikosti te postizanja većih prinosa i zarade, potaknula je brojna istraživanja o uporabi aditiva, pesticida, hormona i genetski modificiranih organizama u pogledu sigurnosti prehrane ljudi i proizvodnje zdravstveno ispravne hrane. Od 1920. godine kada je utvrđeno da pojedini aditivi sprječavaju razvoj mikroorganizama i imaju važnu ulogu u produžavanju roka valjanosti proizvoda od mesa, započela je njihova znatnija uporaba u prehrambenoj industriji (Janssen, 1997.). U mesnoj industriji iz tehnoloških razloga proizvodnje i prerade te skladištenja proizvoda od mesa uporabljaju se nitriti i polifosfati. Najveće dopuštene količine (NDK) nitrita izražene kao natrijev nitrit (NaNO_2) te polifosfata izražene kao fosforov pentoksid (P_2O_5) u proizvodima od

mesa u Republici Hrvatskoj određene su Pravilnikom o prehrambenim aditivima (N.N. 81/2008.). Sistematizacija proizvoda od mesa po kategorijama, skupinama, podskupinama i proizvodima sadržana je u Pravilniku o proizvodima od mesa (N.N. 01/2007.).

Nitriti su natrijeve, odnosno kalijeve soli nitritne kiseline, bezbojni do slabožućkasti kristali koji su dobro topljivi, naročito u toploj vodi. Kemijski nisu postojani, osobito ako se nalaze uz organsku tvar, u kiseloj sredini ili na povišenoj temperaturi. Mesu daju karakterističnu crvenu boju (nitrozo-mioglobinski i hemoglobinski pigmenti), poboljšani okus i teksturu proizvoda od mesa, a njihov primarni cilj je sprječavanje germinacije spora bakterije *Clostridium botulinum* i produkcije botulina (Janssen, 1997., Kovačević, 2001.). Ispitivanja su toksičnosti nitrita pokazala su da povećani unos nitrita u organizam uzrokuje razgradnju

Dr. sc. Jelka PLEADIN, dipl. inž. biotehnol., znanstvena suradnica, Nina PERŠI, dipl. inž. preh. tehnol., stručna suradnica, Hrvatski veterinarski institut, Zagreb; dr. sc. Jelena ĐUGUM, dipl. inž. preh. tehnol., docentica, Ministarstvo poljoprivrede, ribarstva i ruralnog razvoja, Zagreb

eritrocita i vitamina A. Akutna toksičnost nitrita detektirana je samo pri visokim razinama njihove uporabe tvorbom methemoglobina, a dokazano je i nastajanje nitrozamina koji imaju izrazitu karcinogenu aktivnost (Branen i sur., 1990., Verhagen, 1997.).

Polifosfati su natrijeve i kalijeve soli fosforne kiseline, bijeli higroskopni prah topljiv u vodi (Food and Nutrition Board, 1997.). Polifosfati u mesu djeluju kao ionoizmjenjivači i na taj način izvlače divalentne katione iz veza s proteinima, cijepaju proteine i povećavaju broj slobodnih funkcionalnih skupina aminokiselina, odnosno, povećavaju sposobnost vezivanja vode, a stabiliziraju i boju, miris i okus mesa, što je rezultat povećanja antioksidacijskog djelovanja (Kovačević, 2001.). Komercijalni pripravci polifosfata obično sadrže 50-60% fosfora izraženog kao P_2O_5 . Ograničenja koja se odnose na uporabu polifosfata u ljudskoj prehrani pojašnjavaju se činjenicom da uzrokuju poremećaj u resorpciji i otpušanju kalcija iz kostiju.

Ovaj rad daje pregled rezultata analiza određivanja količine natrijevog nitrita (mg/kg) i polifosfata (g/kg) u različitim kategorijama, odnosno skupinama proizvoda od mesa, a koji su u Laboratorij za analitičku kemiju dostavljeni na analizu od strane više mesnih industrija tijekom 2008. i u prvoj polovini 2009. godine.

Materijali i metode

Količine nitrita i polifosfata određivane su na ukupno 640 proizvoda od mesa i to: polutrajnih kobasica

(180 uzoraka), obarenih i ostalih kobasica (297), konzervi (66 uzoraka), trajnih suhomesnatih proizvoda (26 uzoraka), polutrajnih suhomesnatih proizvoda (36 uzoraka) i ostalih proizvoda od mesa (35 uzoraka). Uzorci su homogenizirani pomoću analitičkog mlina, pohranjeni u plastičnim posudicama na +4°C te analizirani u kratkom vremenskom periodu primjenom standardnih analitičkih metoda. Sve su uporabljene kemikalije korištene u analizama bile analitičke čistoće. Spektrofotometrijsko očitavanje apsorbancija provedeno je na spektrofotometru Hach DR/4000U, a umjeravanje pomoću DR/Check Absorbance standard kit (Hach, SAD).

Određivanje količine nitrita

Odvagano je 5 g homogeniziranog uzorka, dodano 50 ml vruće vode i ostavljeno mućkati 15 min na tresilici. Pomoću 1M natrijeve lužine podešene su pH vrijednosti na 8,0 – 8,5. Nakon zagrijavanja u vodenoj kupelji uz protresanje, sadržaj je ohlađen i prebačen kvantitativno u odmjernu tikvicu od 100 mL te je dodano po 2 mL prethodno pripremljenih otopina Carrez br. 1 i Carrez br. 2 uz miješanje nakon svakog dodavanja. Sadržaj je tikvica nadopunjen vodom do oznake, promućkan i filtriran preko nabranog filter papira. Bistri filtrati su korišteni za određivanje nitrita. Za izradu baždarnе krivulje iz stock otopine ($\rho(\text{NaNO}_2) = 20 \text{ mg/l}$) pripremljene su serije otopina koje sadrže 0,13 mg, 0,27 mg, 0,40 mg i 0,53 mg nitritnih iona. U vodenom ekstraktu ispitnog uzorka, nitriti su uz dodatak obojenih reagenasa, tretirani sulfanilamidom i N-(1-naftil)-etilendiaminom

Tablica 1. Kriteriji prihvatljivosti rezultata validacijskih parametara spektrofotometrijskih metoda određivanja količine nitrita i polifosfata u proizvodima od mesa

Parametar	Kriterij prihvatljivosti
Istinitost	raspon certificiranog referentnog materijala
Ponovljivost - ponovljivost mjerenja - ponovljivost pripreme uzorka	RSD $\leq$ 0,5% RSD $\leq$ 1%
Unutarlaboratorijska obnovljivost	RSD $\leq$ 3%
Robusnost	informacija
Linearnost	$k \geq 0,999$
Matriks efekt	usporedba pravca linearnosti i matriksa
Stabilnost otopina uzoraka	informacija

dihidrokloridom. Nakon 30 minuta, paralelno sa slijepom probom, crveno obojenim otopinama izmjerene su apsorbancije spektrofotometrijski pri valnoj duljini od 540 nm te su računski određene količine natrijevog nitrita u ispitnim uzorcima.

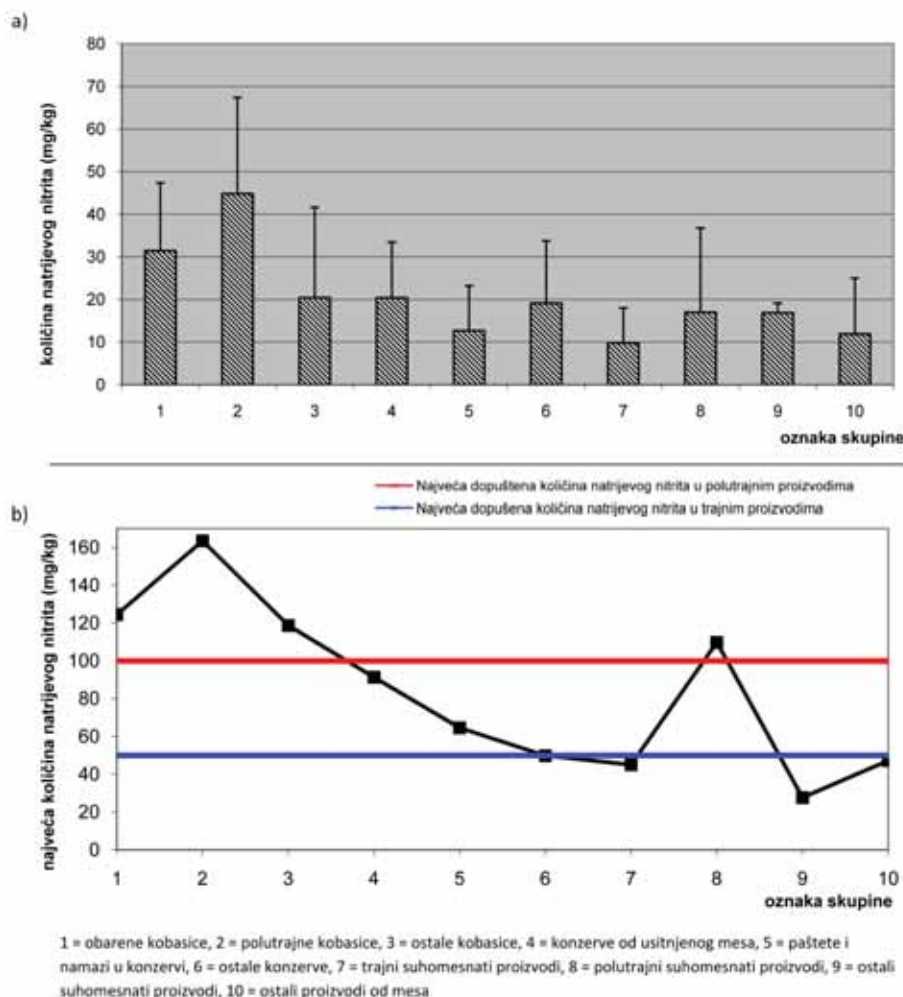
Određivanje količine polifosfata

U porculanskim lončićima izvagano je 2,5 g homogeniziranog uzorka, spaljeno u mufolnoj peći pri 550°C tijekom 6 sati te ostavljeno u sušioniku na 103°C tijekom pola sata. Na spaljenom mineralnom ostatku, nakon hlađenja u eksikatoru, provedena je kiselinska hidroliza uz dodatak 5 ml razrijeđene nitratne kiseline (1+2). Nakon hlađenja sadržaj je kvantitativno prenesen u odmjernu tikvicu od 50 mL, dopunjen destiliranom vodom do oznake i promućkan. Slijedila je filtracija, pipetiranje 10 mL bistrog filtrata u tikvicu od 50 mL, dodatak 15 mL obo-

jenog reagensa i razrjeđivanje, pri čemu u smjesi s amonij-monovanadatom i amonij-heptamolibdatom nastaje žuto obojeni spoj. Paralelno su pripremljene otopine koje sadrže 10 µg, 20 µg, 30 µg, 40 µg, 50 µg i 60 µg P₂O₅/mL za izradu baždarne krivulje i slijepa proba. Spektrofotometrijsko mjerenje provedeno je pri valnoj duljini od 430 nm te je izračunat sadržaj fosfora, odnosno polifosfata u uzorku.

Validacija analitičkih metoda

Validacija primijenjenih spektrofotometrijskih metoda uključivala je određivanje sljedećih validacijskih parametara: ponovljivosti (ponovljivost mjerenja i ponovljivost pripreme uzorka), unutarlaboratorijske obnovljivosti (intermedijarna preciznost), istinitosti, robusnosti, reproducibilnosti (obnovljivost), linearnosti, stabilnosti otopina uzoraka i matriks efekta. Pritom su korišteni certificirani refer-



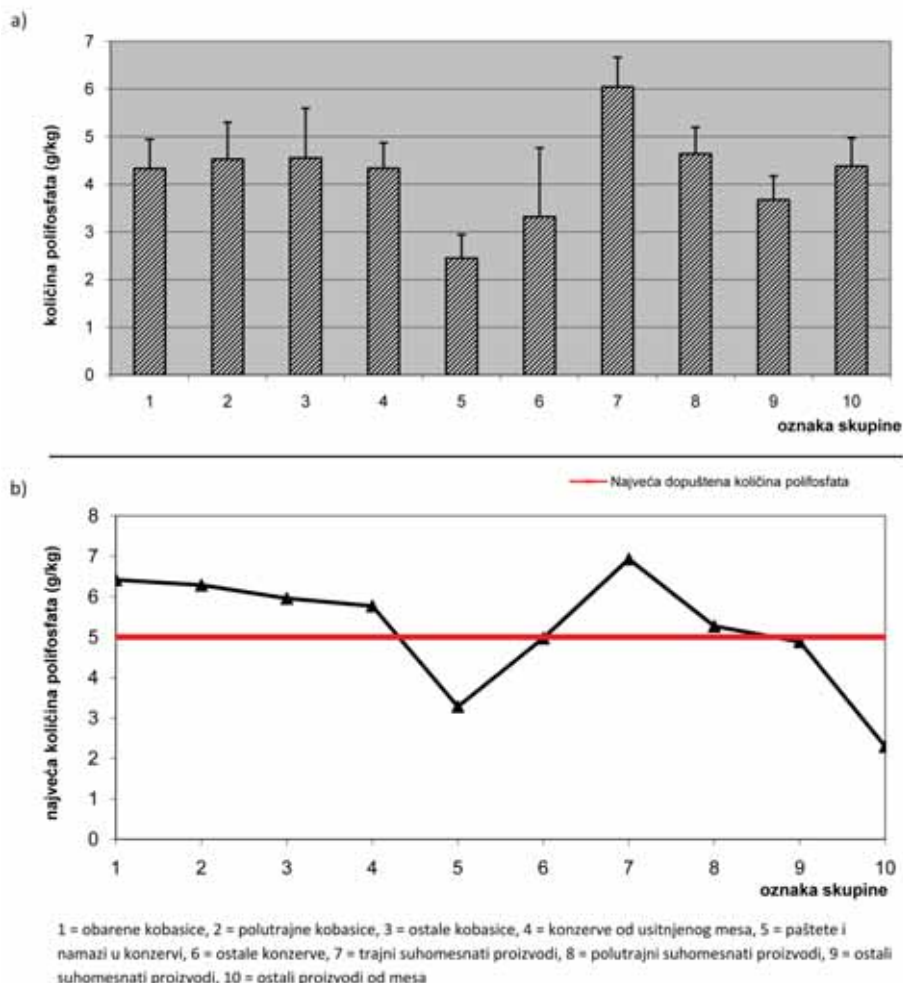
Slika 1. Količina natrijevog nitrita (mg/kg) po skupinama proizvoda od mesa:
a) srednje vrijednosti $\pm$ SD, b) vršne vrijednosti

entni materijali liofiliziranog mesa s označenim sadržajem nitrita od 106 ± 26 mg/kg (Fapas, Engleska) odnosno sadržajem fosfora od 1430 ± 100 mg/kg (Nist, SAD). Validacija je provedena sukladno zahtjevima Pravilnika o provođenju analitičkih metoda i tumačenju rezultata (N.N. br. 2/2005.), a rezultati su uspoređivani s kriterijima

prihvatljivosti zadanim za ispitne validacijske parametre (tablica 1).

Rezultati i rasprava

Usporedbom s kriterijima prihvatljivosti definiranim za svaki validacijski parametar, utvrđena je prihvatljivost rezultata validacije, a time i prikladnost primijenjenih analitičkih metoda za



Slika 2. Količina polifosfata (g/kg) po skupinama proizvoda od mesa:
a) srednje vrijednosti $\pm$ SD, b) vršne vrijednosti

određivanje razina nitrita (mg/kg) i polifosfata (g/kg) u proizvodima od mesa. Količina nitrita i polifosfata određivana je u različitim kategorijama, odnosno proizvodima od mesa, i to: kobasicama (obarene, polutrajne i ostale kobasice), konzervama (konzerve od usitnjenog mesa, paštete i namazi i ostale konzerve), suhomesnatim proizvodi-

ma (trajni, polutrajni i ostali suhomesnati proizvodi) te ostalim proizvodima od mesa. Rezultati analiza su tumačeni uzimajući u obzir NDK definirane Pravilnikom o prehrambenim aditivima (N.N. 81/2008.) od 50 mg/kg do 175 mg/kg NaNO_2 u ovisnosti o vrsti proizvoda od mesa te polifosfata od 5 g/kg P_2O_5 za sve proizvode od mesa.

Rezultati analiza (slika 1.a) pokazuju da su najveće srednje vrijednosti natrijevog nitrita ($\pm$ SD) određene u polutrajnim kobasicama ($44,83 \pm 22,56$ mg/kg), dok su najniže vrijednosti određene u trajnim suhomesnatim proizvodima ($9,80 \pm 8,21$ mg/kg). Od ukupno 640 analiziranih uzoraka, razina natrijevog nitrita veća od NDK određena je u 13 uzoraka i to kobasica i polutrajnih suhomesnatih proizvoda što je 2% u odnosu na ukupan broj ispitanih uzoraka. Najviše su razine (>100 mg/kg) određene u uzorcima šunke u ovitku, šunkarice i dimljene vratine. Slika 1b prikazuje vršne vrijednosti razine natrijevog nitrita određene u svakoj skupini ispitnih uzoraka. Literaturni podatci govore da je količina nitrita od 5 do 20 mg/kg dostatna za održavanje crvene boje mesa, 50 mg/kg za proizvodnju karakterističnog okusa, a 100 mg/kg za antimikrobno djelovanje (Branen i sur., 1990.).

Srednje vrijednosti polifosfata (mean $\pm$ SD) po skupinama proizvoda od mesa prikazane su na slici 2a. Znaatan broj uzoraka polutrajnih kobasica (39 uzoraka), obarenih i ostalih kobasica (30 uzoraka), trajnih suhomesnatih proizvoda (18 uzoraka) te polutrajnih suhomesnatih proizvoda (6 uzoraka) s razinama polifosfata (g/kg) prelazio je NDK od 5 g/kg. U odnosu na ispitani broj uzoraka po kategorijama, zahtjevima Pravilnika nije udovoljavalo 22% polutrajnih kobasica, 10% obarenih i ostalih kobasica, 69% trajnih suhomesnatih proizvoda te 16% polutrajnih suhomesnatih proizvoda. Rezultati ovog ispitivanja (slika 2b) pokazuju i da je u pojedinim uzorcima gotovo svake

skupine proizvoda od mesa određena količina polifosfata iznad NDK.

Najveće su količine polifosfata određene u trajnim suhomesnatim proizvodima ($6,05 \pm 0,62$ g/kg) s visokim sadržajem proteina kao što je pršut, suha vratina i pečenica. Dodatkom polifosfata u količinama većim od tehnološki potrebnih dolazi do vezivanja vode u proizvod, čime se mijenja njegova prehrambena vrijednost i dobiva proizvod lošije kvalitete. Važno je međutim naglasiti da su pritom u trajnim suhomesnatim proizvodima analizom sirovih proteina i ukupnog fosfora određene visoke razine prirodnog fosfora, a time i ukupnih polifosfata. Stoga bi općenito za valjanu interpretaciju sadržaja ukupnog fosfora, odnosno polifosfata bilo bitno poznavanje prirodnih razina fosfora u sirovinama koje ulaze u sastav proizvoda od mesa. Postoje oprečna mišljenja o razinama ukupnog fosfora, odnosno polifosfata u kvalitetnim proizvodima od mesa te o činjenici da je NDK za polifosfate jedinstvena bez obzira na vrstu proizvoda od mesa. Rezultati drugih autora pokazali su da kvalitetno meso u udjelu u kojem se dodaje u mesni proizvod (do 40%), ne nosi znatno velike količine fosfora, nego da one potječu upravo od dodanih fosfatnih aditiva u količinama koje su više od tehnoloških potreba, odnosno cilja vezivanja vode u proizvodima lošije kvalitete te da je time sadržaj fosfora u mesnom proizvodu veći od NDK (Katalenić, 2004.). Daljnja ispitivanja pokazuju da kvalitetni proizvodi s većom količinom mesa imaju i veće količine ukupnog fosfora, a što može utjecati na krivu procjenu

zdravstvene ispravnosti proizvoda (Serdar i Katalenić, 2005.). Stoga je predložena veća razina NDK od 7 g/kg za ukupne polifosfate, a kojom bi se mogla održati tehnološka nužnost za visokovrijedne mesne proizvode uz obvezu jasnog deklariranja količine mesa u mesnom proizvodu. Nakon dugogodišnjeg rada na analitici polifosfata u različitim proizvodima od mesa i utvrđenom visokom postotku trajnih suhomesnatih proizvoda koji ne udovoljavaju trenutnim zahtjevima Pravilnika i naša saznanja govore u prilog predloženom.

Sažetak

U cilju poboljšanja teksture i okusa te produljenja trajnosti proizvoda od mesa, u mesnoj industriji znatna je uporaba aditiva nitrita i polifosfata. Uporaba aditiva u proizvodima od mesa je ograničena, a najveće dopuštene količine (NDK) nitrita (mg/kg) te polifosfata (g/kg) definirane su Pravilnikom o prehrambenim aditivima (N.N. 81/2008.) po vrstama proizvoda od mesa.

U ovom ispitivanju od ukupno 640 analiziranih uzoraka razina natrijevog nitrita veća od NDK određena je u 13 uzoraka i to kobasica i polutrajnih suhomesnatih proizvoda, a što je 2% u odnosu na ukupan broj analiziranih uzoraka. Najviše razine natrijevog nitrita (srednja vrijednost $\pm$ SD) određene su u skupini polutrajnih kobasica ($44,83 \pm 22,56$ mg/kg), a najniže u trajnim suhomesnatim proizvodima ($9,80 \pm 8,21$ mg/kg). U odnosu na uku-

pni broj ispitanih uzoraka po kategorijama, zahtjevima Pravilnika u pogledu količine polifosfata nije udovoljavalo 22% polutrajnih kobasica, 10% obarenih i ostalih kobasica, 69% trajnih suhomesnatih proizvoda te 16% polutrajnih suhomesnatih proizvoda. Najveća razina polifosfata određena je u trajnim suhomesnatim proizvodima ($6,05 \pm 0,62$ g/kg) s visokim sadržajem proteina.

Razine aditiva nitrita i polifosfata u proizvodima od mesa nužno je optimizirati poznavajući zahtjeve tehnološkog procesa te uz primjenu ispitanih analitičkih metoda osigurati kvalitetu i sigurnost hrane animalnog podrijetla s konačnim ciljem zaštite zdravlja potrošača.

Literatura

1. BRANEN, A. L., P. M. DEVIDSON and S. SALMINEN (1990): Food Additives, Marcel Dekker, Inc. New-York, Basel (434-473).
2. Food and Nutrition Board, Institute of Medicine. Phosphorus. Dietary Reference Intakes: Calcium, Phosphorus, Magnesium, Vitamin D, and Fluoride (1997): Washington D.C., National Academy Press, 146-189.
3. JANSSEN, M. M. T. (1997): Food additives. In: De Vries, J.: Food Safety and Toxicity. CRC Press LLC, Florida (Chapter five).
4. KATALENIĆ, M. (2004): Emulgatorske soli. *Meso* 4, 45-51.
5. KOVAČEVIĆ, D. (2001): Kemija i tehnologija mesa i ribe Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Prehrambeno tehnološki fakultet, Osijek (192-193).
6. Pravilnik o prehrambenim aditivima. Ministarstvo zdravstva i socijalne skrbi (N. N. br. 81, 2008.).
7. Pravilnik o proizvodima od mesa.

- Ministarstvo poljoprivrede, šumarstva i vodnog gospodarstva (N. N. br. 1, 2007.).
8. Pravilnik o provođenju analitičkih metoda i tumačenju rezultata. Ministarstvo poljoprivrede, šumarstva i vodnog gospodarstva (N. N. br. 2, 2005.).
 9. SERDAR, M. i M. KATALENIĆ (2005): Količine prirodnog fosfora u mesu peradi. Meso 5, 40-44.
 10. VERHAGEN, H. (1997): Adverse effects of food additives. In: De Vries, J.: Food Safety and Toxicity. CRC Press LLC, Florida (Chapter nine).

The Level of Nitrites and Polyphosphates in Meat Products

Jelka PLEADIN, B.Sc. in Biotechnology, Ph.D., Scientific Advisor, Nina PERŠI, B.Sc. in Food Technology, Expert Advisor, Croatian Veterinary Institute Zagreb; Jelena ĐUGUM, B.Sc. in Food Technology, Ph.D., Assistant Professor, Ministry of Agriculture, Fisheries and Rural Development, Zagreb

To achieve better texture, flavour and longer shelf life of meat products, nitrites and polyphosphates are used as additives in meat industry. Their application in meat products is limited and maximum permitted levels of nitrites (mg/kg) and polyphosphates (g/kg) are defined according to category of meat product in the Regulations on Food Additives (Official Gazette No. 81/2008). In this investigation, which was carried out on 640 samples, the level of sodium nitrite higher than maximal permitted level was determined in 13 samples of sausages and semi-dry meat products and that was about 2% in correlation to total number of analysed samples. The maximum level of sodium nitrite (mean±SD) was determined in category of semi-dry sausages (44.83±22.56 mg/kg) and minimum level in fermented

meat products (9.80±8.21 mg/kg). In comparison with total number of investigated samples in all categories regarding content of polyphosphates in 22% of semi-dry sausages, 10% of pasteurised and other sausages, 69% of fermented and 16% of semi-dry meat products did not meet the defined requirements. The maximum level of polyphosphates was determined in fermented meat products (6.05±0.62 g/kg) with high level of proteins. The level of nitrites and polyphosphates as additives in meat products is necessary to optimize known requirements of technological process and with application of examined analytical methods to insure quality and safety of food from animal origin with the final aim of consumer health protection.

Bedrenica – prikaz epizootije bolesti u Bobovcu (Sunja)

Boris Habrun, Gordan Kompes i Branka Šeol



Uvod

Bedrenica (antraks) je akutna bakterijska bolest prvenstveno biljoždera prenosiva na čovjeka. Od biljoždera najosjetljiviji su ovca i govedo, dok su nešto manje osjetljivi koza i konj. S obzirom na primljivost, čovjek je između ove skupine i relativno rezistentnih svinja, pasa i mačaka (Cvetnić, 2002.). Od bedrenice mogu oboljeti i drugi sisavci. Uzročnik bolesti je *Bacillus anthracis*, gram-pozitivna bakterija štapičasta oblika koja tvori spore (Anon. 2008.). Bolest je opisana kao 5. kuga još 1491. godine prije Krista (Bradarić, 2006.).

Biljožderi se obično zaraze ingestijom spora koje se nalaze u okolišu, u prvom redu u kontaminiranom tlu, u kojem spore prežive desetljećima. Iz tla se kontaminiraju krmiva koja rastu na kontaminiranom tlu. Voda može biti kontaminirana preko lešina ili naplavinama kontaminirana tla. Područja s kontaminiranim tlom nazivaju se bedrenični distrikti (Cvetnić, 2002., Anon. 2008.).

Nakon ingestije spora, osjetljivi biljožderi obično ugibaju unutar 24 sata. Na uginuljoj se životinji uočava generalizirana septikemija s izrazito povećanom slezenom. Pulpa slezene je kašasta ili tekuća. Organi izgledaju kao da su poprskani krvlju. Iz nozdru, usta, anusa i rodnice cijedi se krv (Cvetnić, 2002., Radostits i sur., 2000.).

Epizootije vezane uz infekciju preko kontaminirana tla uvijek se pojave nakon velikih klimatskih promjena, kao što su jake kiše nakon dužeg razdoblja suše kad je temperatura okoliša viša od 15 °C (Cvetnić, 2002.).

U novije vrijeme bedrenica je ipak vrlo rijetka bolest, zahvaljujući sustavnoj imunoprofilaksi životinja. Veliku ulogu u spriječavanju izbijanja bedrenice ima i drenaža livada i pašnjaka (Cvetnić, 2002.).

U Hrvatskoj se posljednjih desetljeća ova bolest javlja sporadično, a pretposljednja masovnija pojava bedrenice zabilježena je 2002. godine kod Jasenovca (Šošćarić i sur., 2002.).

Dr. sc. Boris HABRUN, dr. vet. med., znanstveni savjetnik; Gordan KOMPES, dr. vet. med., znanstveni novak, Hrvatski veterinarski institut, Zagreb; dr. sc. Branka ŠEOL, dr. vet. med., izvanredna profesorica, Veterinarski fakultet Zagreb

Svrha ovog rada je prikaz epizootije bedrenice koja se javila u selu Bobovac kod Sunje od kolovoza 2006. do ožujka 2007. godine.

Materijal i metode

U razdoblju od 08. kolovoza do 02. listopada 2007. godine u Laboratorij za opću bakteriologiju i mikologiju Hrvatskog veterinarskog instituta dostavljeno je 11 uški goveda s okolnim mišićjem radi pretrage na bedrenicu iz Veterinarske ambulante Sunja.

Iz anamnestičkih podataka bilo je razvidno da su sve životinje bile napasivane na istom pašnjaku kraj sela Bobovac.

U ožujku i travnju 2007. godine zaprimljene su još 3 uške s okolnim mišićjem goveda iz Bobovca.

Osim uški, pretraženo je i devet bočica tri različite serije cjepiva antraksa. Prva serija pretražena cjepiva bila je ona koja je korištena u imunoprofilaksi u veljači 2007. godine, a druge dvije serije cjepiva su pretražene prije ponavljanja imunoprofilakse u proljeće/ljeto 2007. Cjepivo antraksa bilo je pretraživano radi određivanja broja živih spora Sterneovog soja 34F2 u uzorcima vakcine.

Izdvajanje uzročnika

Dostavljeni materijal (uška s okolnim mišićjem) bio je naciepljen na krvni agar sa 5% defibrinirane ovčje krvi. Radi provjere kontaminacije gram-negativnim bakterijama uzorak je bio istodobno naciepljen i na XLD agar (Quinn i sur., 1994.).

Nakon inkubacije pri 37±1 °C tijekom 18-24 sata, ploče su pregledavane i tražene su kolonije koje morfološki odgovaraju pripadnicima roda *Bacillus*, da nisu hemolične ili da imaju vrlo oskudnu zonu hemolize (slika 1). Pod malim povećanjem gledano je svija li se kraj kolonije (kovrča se) čime daje oblik meduze (slika 1 i slika 2). Kolonije takva oblika bile su precijepljene na krvni agar radi daljnje identifikacije (Quinn i sur., 1994., Anon. 2004.).

Identifikacija

Određivanje tvorbe kapsule.

Čista kultura bila je naciepljena na Columbia agar base u koji je bilo dodano 0,7% Natrij bikarbonata, nakon čega je takva ploča bila inkubirana u mikroaerofilnim uvjetima (Genbox CO₂, BioMerieux). Nakon inkubacije od 18-24 sata izrasla su kolonije „S“ oblika što je dokaz tvorbe kapsule. Tvorba kapsule je dokazivana i direktnim razmaskom krvi iz dostavljenih uški s okolnim mišićjem i bojenjem razmaska po Fothu.

Određivanje osjetljivosti

Ovaj se test radi klasičnom disk difuzijskom metodom (NCCLS M31 A2, 2002.), gdje se koristi Muller Hinton agar i disk penicilina koji sadrži 10 IU penicilina (Becton Dickinson). Test služi za razlikovanje vrsta *Bacillus anthracis* (osjetljiva vrsta) i *Bacillus cereus* (neosjetljiva vrsta).

Osim određivanja osjetljivosti prema peniclinu, odredili smo osjetljivost i prema ampicilinu (AM, 10µg), amoksisiclinu s klavulanskom kiselinom

(AMC 20/10 μ g), ceftiofuru (CFT 30 μ g), eritromicinu (E 15 μ g), streptomycinu (S 10 μ g), neomicinu (N 30 μ g), gentamicinu (GM 10 μ g), spektinomycinu (SPT 100 μ g), enrofloksacinu (ENO 5 μ g), oksitettraciklinu (T 30 μ g), sulfametoksazolu sa trimetiprimom (SXT 23,75/1,25 μ g) i florfenikolu (FFC 30 μ g). Za kontrolu postupka korišten je soj *Escherichia coli* ATCC 25922.

Određivanje pokretljivosti

Pokretljivost je određivanja na način da se izolat za koji se sumnja da pripada vrsti *Bacillus anthracis* nacijepio u triptikaza soja bujon, inkubirao pri 37 $\pm$ 1 $^{\circ}$ C 24 sata i mikoskopirao u tamnom polju. Sojevi vrste *Bacillus anthracis* su nepokretni za razliku od sojeva vrste *Bacillus cereus*.

Kontrola cjepiva antraksa

Kako je riječ o živom cjepivu koje sadrži u sebi žive spore Sterneovog

soja 34F2, kontrola cjepiva se provodi određivanjem broja kolonija u mL (CFU/mL) koju smo proveli u skladu s tada važećom normom HRN EN ISO 7218:1999, koristeći preporučene podloge od Međunarodnog ureda za epizootije (Anon. 2004.).

Kontrolirane su tri serije cjepiva. Kod kontrole prve serije (kojom su životinje imunizirane u Sunji i okolici u veljači 2007.) pretražena je po jedna bočica iz Veterinarske ambulante Sunja i Hrvatskog veterinarskog instituta.

Kod kontrole druge serije pretražene su tri bočice koje su bile skladištene kod proizvođača, a kod kontrola treće serije pretražene su po dvije bočice pohranjene kod proizvođača i dvije bočice pohranjene u Hrvatskom veterinarskom institutu. Druga i treća serija bile su pretražene prije ponavljanja imunoprofilakse u svibnju /lipnju 2007.

Tablica 1. Rezultati postignuti određivanjem osjetljivosti 6 izolata vrste *Bacillus anthracis* disk difuzijskom metodom

Antimikrobni lijek	Osjetljivi	Umjereno osjetljivi	Neosjetljivi
Penicilin G	6	0	0
Ampicilin	6	0	0
Amoksisicilin + klavulanska kiselina	6	0	0
Ceftiofur	3	1	2
Eritromicin	6	0	0
Streptomycin	6	0	0
Neomicin	6	0	0
Gentamicin	6	0	0
Spektinomycin	6	0	0
Oksitettraciklin	6	0	0
Enrofloksacin	6	0	0
Sulfametoksazol +trimetoprim	0	0	6
Florfenikol	6	0	0

Rezultati

Bakteriološkom pretragom 11 dostavljenih uški s okolnim mišićjem tijekom 2006. godine iz devet uški je izdvojena bakterija *Bacillus anthracis* (izrasle kolonije R oblika, bez hemolize na krvnom agaru, tvorba kapsule u hranjivom agaru s 0,7% Na bikarbonata i uzgojem u mikroaerofilnoj atmosferi, nepokretne, osjetljive na penicilin, kovrčanje nakon 48 sati inkubacije).

Od tri uške dostavljene u 2007. godini, pretraga dvije uške završena je negativnim rezultatom, a iz jedne je izdvojena bakterija *Bacillus anthracis*.

Iz šest izolata je određena osjetljivost disk difuzijkom metodom, a postignuti rezultati su prikazani u tablici 1.

Postignuti rezultati ukazuju da su izdvojeni izolati bili osjetljivi prema svim testiranim antimikrobnim lijekovima osim sulfametoksazola s trimetoprimom i ceftiofura.

Kontrolom cjepiva prve serije (rok valjanosti 03/07.) (koja je korištena u imunoprofilaksi životinja u Sunji i



Slika 1. Bakterija *Bacillus anthracis* nakon 24 sata inkubacije na krvnom agaru. Vide se kolonije R oblika, bez hemolize i s laganim uvijanjem (kovrčanjem) kolonija (zbirka Laboratorija za opću bakteriologiju i mikologiju Hrvatskog veterinarskog instituta)



Slika 2. Bakterija *Bacillus anthracis* nakon 48 sati inkubacije na krvnom agaru (fotografija iste petrijeve ploče kao na slici 1.). U odnosu na sliku 1 vidi se izraženije uvijanje kolonija. (zbirka Laboratorija za opću bakteriologiju i mikologiju Hrvatskog veterinarskog instituta)

okolici u veljači 2007.) utvrđeno je svega oko 20×10^4 živih spora u 1 mL u obje pretražene bočice. Kontrolom druge serije (rok valjanosti 05/07.) (kojom je trebalo ponovo cijepiti životinje) oko 1×10^6 živih spora u 1 mL, a u trećoj seriji (rok valjanosti 05/07.) oko 29×10^5 živih spora u 1 mL. Cjepivo je po deklaraciji trebalo sadržavati najmanje 2×10^6 živih spora u 1 mL. Rezultati pretraživanja istih serija cjepiva su se podudarali bez obzira je li bočica bila skladištena u Veterinarskoj ambulanti Sunja, Hrvatskom veterinarskom institutu ili kod proizvođača.

Rasprava

Početkom kolovoza 2006. godine nekoliko iznenadnih uginuća goveda na jednom pašnjaku blizu Bobovca (Sunja) potaklo je sumnju na pojavu bedrenice.

Iz anamnestičkih podataka uvidjelo se da je riječ o ugibanju na samo jednom pašnjaku gdje ranije nisu

zabilježena ovakva uginuća. Epizootija bedrenice na tom pašnjaku izbila je najvjerojatnije zbog toga što je uz rub pašnjaka nekada bilo stočno groblje. Na mjestu nekadašnjeg stočnog groblja napravljeno je pojilo za životinje. Radi izgradnje pojila dio tog stočnog groblja bio je prekopan (postavljanje vodovodnih cijevi). Ovim su spore iz zakopanih lešina prekopanjem polja najvjerojatnije pristigle bliže površini pašnjaka.

U vrijeme izbivanja bolesti na tom je području bilo puno kišnih dana te je rast podzemnih voda (neposredna blizina rijeke Save) također doprinio približavanju spora površini pašnjaka. Prema današnjim spoznajama, spore bakterije *Bacillus anthracis* mogu u tlu preživjeti više desetljeća. To znači da ukoliko je i prije više desetljeća na tom stočnom groblju bila zakopana lešina uginula od bedrenice prekopanje tla i postavljanje cijevi za pojilo moglo je dio spora iznijeti na površinu tla ili blizu površine, a daljnjem dolasku spora na površinu tla mogla je pridonijeti i velika količina oborina i dizanje razine podzemnih voda.

Dostavljeni su uzorci potvrdili sumnju, jer je iz 9 od 11 dostavljenih uški pretraženih od kolovoza do listopada 2006. godine izdvojen uzročnik bedrenice. Nakon dijagnoze bolesti propisane su iste mjere koje su uspješno zaustavile epizootiju nekoliko godina ranije kod Jasenovca (Šošćarić i sur., 2002.), a to su:

- sve papkare i kopitare povući s pašnjaka gdje je izbila bedrenica,
- terapijati životinje tijekom 5 dana jednim od antimikrobnih lijekova na koji je uzročnik osjetljiv,

- nakon završetka terapije pričekati barem 7 dana od zadnje aplikacije antibiotika (10 dana ako je riječ o antibioticima koji djeluju dulje od 1 dana, npr. teško topivi penicilini, retard oblici tetraciklina i dr.) do cijepljenja,
- cijepiti sve životinje cjepivom protiv bedrenice i ostaviti ih u štali idućih 7 – 10 dana da se razvije imunost.

Nakon isteka tog razdoblja životinje opet mogu ići na pašu.

Predložene mjere u ovom slučaju nisu ostvarile potpun uspjeh (nekoliko naknadnih uginuća od bedrenice na istom području).

Da bi životinja bila zaštićena od bedrenice cijepljenjem, goveda i konji moraju primiti barem 1×10^7 živih spora, a ovce, koze i svinje $1-5 \times 10^6$ živih spora u dozi cjepiva (Anon. 2008.). Cijepljenje je provedeno u kolovoza cjepivom čiji je rok uporabe bio do kraja kolovoza 2006. godine, a nekoliko naknadnih uginuća se desilo u rujnu i listopadu, kada nije bilo svrhovito kontrolirati korišteno cjepivo kojem je već istekao rok trajanja, jer nakon isteka roka cjepiva više ne mora odgovarati deklaraciji proizvođača.

Izdvojeni izolati bakterije *Bacillus anthracis* bili su osjetljivi prema svim testiranim antimikrobnim lijekovima osim sulfametoksazolu s trimetoprimom (svi izolati neosjetljivi) i ceftiofura (tri izolata osjetljiva, jedan umjereno osjetljiv i dva neosjetljiva). Iako je terapija antraksa redovito neučinkovita, može ostvariti dobre rezultate ako se otkriju životinje koje imaju vrućicu, a još nisu razvile druge znakove bolesti, dakle u najranijem stadiju bolesti (Radostitis i sur., 2000.). Određivanje osjetljivosti

bilo je svrsishodno i radi određivanja preventivnih mjera (profilaktičko davanja antibiotika kako bi se spriječilo oboljevanje životinja koje su možda bile u inkubaciji) te da se liječnicima olakša odabir antimikrobnog lijeka ukoliko tko od ljudi koji su bili u kontaktu s bolesnim životinjama oboli.

Nakon cijepljenja po izbijanju epizootije u kolovozu 2006., životinje su cijepljene i u veljači 2007. godine prije izгона na pašu.

U proljeće 2007. godine desilo se jedno uginuće junice od bedrenice na istom području. Životinja je bila dobrog gojnog stanja i cijepljena protiv bedrenice 30-ak dana prije uginuća.

Radi toga su uzete serije cjepiva koje su korištene u cijepljenju životinja na tom području u veljači 2007. godine, po jedna bočica iz ambulate i iz Hrvatskog veterinarskog instituta (gdje se obvezno čuva svaka kontrolirana serija). Kontrolom dvije bočice korištene serije cjepiva utvrđeno je da cjepiva nisu imale dovoljan broj živih spora u sebi (20×10^4 u 1 mL), radi čega nisu imale dostatnu imunogenost. Nije bilo znatne razlike u broju spora u bočici izuzetoj iz nadležne ambulate i Hrvatskog veterinarskog instituta, što govori da je cjepivo u ambulanti bila propisno čuvano (temperatura hladnjaka).

Proizvođač cjepiva je deklarirao da 1 mL cjepiva sadrži najmanje 2×10^6 živih spora, što je i bilo utvrđeno kontrolom cjepiva odmah po proizvodnji, no 2 mjeseca prije isteka valjanosti (rok valjanosti je 12 mjeseci) kod prve serije broj spora je znatno pao (20×10^4) te je cjepivo sadržavalo znatno manji broj živih spora od deklariranog kada je korišteno za imunoprofilaksu.

Radi potpune zaštite životinje odlučeno je da se imunoprofilaksa životinja na tom području ponovi, radi čega su prije korištenja kontrolirana druga i treća serija cjepiva. Jedino je druga serija sadržavala gotovo potreban broj živih spora, no to još uvijek u preporučenoj dozi proizvođača nije bila količina koju preporuča Međunarodni ured za epizootije za učinkovitu zaštitu (Anon. 2008.). Potpuna zaštita životinja postignuta je ponovnim cijepljenjem s time da je u skladu s utvrđenim brojem živih spora u drugoj seriji cjepiva povećana doza od preporučene kako bi životinje primile zadovoljavajući broj živih spora za učinkovit imunogeni odgovor (goveda i konji 1×10^7 živih spora, ovce, koze i svinje $1-5 \times 10^6$ živih spora) (Anon. 2008.). Nakon ponovljenog cijepljenja s dostatnim brojem živih spora u cjepivu završena je epizootija bedrenice u Bobovcu.

Sažetak

U radu je opisana epizootija antraksa koja se javila na području Bobovca (Sunja) tijekom 2006. i 2007. godine. Pretraženo je 14 uški s okolnim mišićjem, od čega 11 tijekom 2006. godine i 3 tijekom 2007. godine. Određena je osjetljivost 6 izdvojenih sojeva prema 13 antimikrobnih lijekova. Prvim pozitivnim nalazima u kolovozu 2006. potvrđena je bedrenica, nakon čega se donose mjere radi suzbijanja iste. Mjere se nisu pokazale učinkovite kao prilikom suzbijanja epizootije bedrenice u Jasenovcu 2002.

godine. Kada je nakon provedene imunoprofilakse jedna životinja uginula od bedrenice u travnju 2007. godine, prekontrolirano je i cjepivo korišteno za imunoprofilaksu životinja na području Bobovca. Utvrđeno je da cjepivo nije imalo dostatan broj živih spora te da je to najvjerojatniji uzrok zbog kojeg životinje nisu bile potpuno imune prema ovoj bolesti. Nakon kontrole cjepiva povećane su doze cjepiva i ponovljeno je cijepljenje kako bi životinje primile zadovoljavajući broj živih spora za kvalitetno stjecanje imunosti. Nakon toga je epizootija prestala. Određivanjem osjetljivosti šest izolata bakterije *Bacillus anthracis* utvrđeno je da su svi sojevi bili osjetljivi prema svim testiranim antimikrobnim lijekovima osim sulfametoksazola s trimetoprimom, prema kojem su svi testirani izolati bili rezistentni.

Literatura

1. Anon. (2004): Anthrax. In: Office International des Epizooties: Manual of Standards for Diagnostic tests and Vaccines. 5th ed. 2004.
2. Anon. (2008): Anthrax. In: Office International des Epizooties: Manual of diagnostics tests and vaccines for terrestrial animals. 6th ed. 2008. Section 2.1.1. *Anthrax*.
3. BRADARIĆ, N. (2006): *Bacillus anthracis* U: BEGOVAC, J., D. BOŽINOVIĆ, M. LISIĆ, B. BARŠIĆ i S. SCHÖNWALD, Infektologija. Profil, Zagreb.
4. CVETNIĆ, S. (2002): Bakterijske i gljivične bolesti životinja. Medicinska naklada Zagreb.
5. HRN EN ISO 7218:1999: Microbiology of food and animal feeding stuffs – general requirements and guidance for microbiological examinations.
6. NCCLS M31 A2 (2002): Performance standards for antimicrobial disk and dilution susceptibility test for bacteria isolated from animals.
7. QUINN, P. J., M. E. CARTER, B. MARKEY and G. R. CARTER (1994): Clinical Veterinary Microbiology. Wolfe publishing, London.
8. RADOSTITS, O. M., C. C. GAY, D. C. BLOOD and K. W. HINCHCLIFF (2000): Veterinary Medicine. A textbook of the diseases of cattle, sheep, pigs, goats and horses. 9th ed. W. B. Saunders Company Ltd. Edinburgh, London, New York, Oxford, Philadelphia, St. Louis, Sydney, Toronto.
9. ŠOŠTARIĆ, B., B. HABRUN, Z. LIPEJ i I. VICKOVIĆ (2002): Prikaz epizootije bedrenice u stadu ovaca i koza. Zbornik sažetaka Veterinarski dani 2002. Rovinj, Hrvatska 17. – 20. 10. 2002.

Anthrax – Epizootic Case in Bobovac (Sunja)

Boris HABRUN, DVM, Ph.D., Scientific Advisor, Gordan KOMPES, DVM, Junior Researcher, Croatian Veterinary Institute, Zagreb; Branka ŠEOL, DVM, Ph.D., Associate Professor, Faculty of Veterinary Medicine, Zagreb

The paper describes anthrax epizootic case in the area of Bobovac (Sunja) in 2006 and 2007. Total 14 ears with the surrounding muscles were tested, 11 in the course of 2006 and 3 in the course

of 2007. Sensitivity of 6 isolated strains to 13 anti-microbe medications was determined. First positive findings in August 2006 confirmed the existence of anthrax, and the measures were ad-

opted to fight it. The measures did not prove efficient as in the fight of anthrax epizooty in Jasenovac, 2002. After the immunoprophylaxis, one animal died of anthrax in April 2007, after which the vaccine used for animal immunoprophylaxis in the area of Bobovac was controlled. It was found that the vaccine did not contain a sufficient number of live spores, which was most probably the reason why the animals were not completely immune to the disease. After the control, vaccine doses

were increased and vaccination was repeated in order for animals to receive a satisfactory number of live spores to acquire immunity in a high quality way, after which the epizooty was stopped. Determination of sensitivity of the six isolates of *Bacillus anthracis* showed that all strains were sensitive to all tested anti-microbe medications except for sulfamethoxazole with trimethoprim, which all the tested isolates were resistant to.

GOSPODARSTVO

ČISTOĆA U KOKOŠINJCIH

Perad pati osobito mnogo od gamadi, e naročito, ako živi u tijesno ograđenom dvorištu. Kokoši koje muči gamad, izgube perje, nakostrušene su, omrševе i malo nose jaja. Ako hoćemo da tomu izbjegnemo, valje nam se pobrinuti, za čistoću i razkuženje kokošinjaka. Svakoga tjedna valja gnoj odstraniti, posuti pod tankim slojem pijeska i povrх toga postaviti novu stelju. Svaki mjesec jedanput mora se kokošinjac pobieliti mliečnom kašom od vapna.

“Hrvat” (Virovitica), 29., 2, 1910 (god.) (24. srpnja 1910).

Transvaginalna ultrazvučna aspiracija blizanaca u kobilu

- prikaz iz prakse

*Iva Getz, Nikica Prvanović, T. Dobranić, T. Karadjole,
Z. Makek, N. Maćešić i Ana Magoči*



Uvod

Blizanačka gravidnost kobilu je ozbiljan problem koji nerijetko završava pobačajem, ranom embrionalnom smrtnošću, preranim porodom ili rađanjem mrtve, slabe i deformirane ždrebadu. Rana dijagnostika blizanačke gravidnosti pruža mogućnosti pravovremene intervencije i na taj način osigurava pozitivan ishod ovog riskantnog oblika gravidnosti. Nakon tvorbe endometrijskih čašica 36. dana gravidnosti, koje ostaju u funkciji 90 do 130 dana bez obzira na prisustvo vitalnog ploda, metode za redukciju blizanaca prilično su nepouzdanu. Metode koje se primjenjuju u svrhu uklanjanja jednog od zametaka su energetska dijeta kobile, ultrazvučna transvaginalna aspiracija jednog embrija, transabdominalna intrakardijalna aplikacija KCl u srce jednog od plodova te u kasnijim fazama

gravidnosti ultrazvučna transabdominalna aspiracija jednog od blizanaca. Najsuvremenija metoda koja se danas najčešće primjenjuje za redukciju blizanaca nakon fiksacije zametaka i tvorbe endometrijskih čašica je transvaginalna ultrazvučna aspiracija jednog od blizanaca (engl. transvaginal ultrasound-guided aspiration, TUGA). Uspjeh provođenja ove metode ovisi o različitim čimbenicima: smještaju embrija, dužini trajanja gravidnosti i o iskustvu doktora veterinarske medicine.

Dosadašnje spoznaje

Blizanačka gravidnost kobilu predstavlja veliki reproduktivni i ekonomski problem iz mnogo razloga; smatra se najčešćim uzrokom nezaraznih

Dr. sc. Iva GETZ, dr. vet. med., docentica, dr. sc. Nikica PRVANOVIĆ, dr. vet. med., docentica, dr. sc. Tomislav DOBRANIĆ, dr. vet. med., redoviti profesor, dr. sc. Tugomir KARADJOLE, dr. vet. med., docent, dr. sc. Zdenko MAKEK, dr. vet. med., redoviti profesor, Nino MAĆEŠIĆ, dr. vet. med., znanstveni novak, Veterinarski fakultet Zagreb; Ana MAGOČI, dr. vet. med.

pobačaja (od 10 do 30%), rane embrionalne smrtnosti ili pak rezultira rađanjem avitalne i deformirane ždrjebadi (Giles i sur., 1993.). Kobile koje pobače u zadnjoj fazi gestacije učestalo imaju posljedičnih problema zbog produžene involucije sada već prevelike maternice; teško ponovno ulaze u ciklus, a još teže koncipiraju. Uzrok visoke razine embrionalne smrtnosti i smanjene vitalnosti oždrebljenih blizanaca je smanjena zaliha krvi povezana s ograničenom zapreminom maternice u kasnijoj fazi gravidnosti (Woods i Hallowell, 1993.).

Pojava blizanaca u kobilu direktno je povezana s multiplom ovulacijom te se bez obzira na ishod učestalo zajedno ponavljaju kod kobilu. Dokazano je da se blizanci mogu dogoditi kako iz sinkrone tako i iz asinkrone multiple ovulacije s razmakom od 2 dana. Postotak koncepcije po folikulu je jednak kod dvostrukih ovulacija na suprotnim jajnicima i kod jedne ovulacije po ciklusu, ali je viši kad se dvostruka ovulacija javi na istom jajniku (Ginther, 1987.). Kod kobilu s blizanačkom gravidnošću utvrđena je visoka razina eCG, a sam postotak pojavnosti blizanačkog graviditeta povezan je s progrediranjem pripusne sezone (Prohl i sur., 1990.). Osim navedenog na pojavnost blizanaca utječe pasmina, hranidba i genetska predispozicija te se oni najčešće javljaju kod toplokrvnih pasmina i mlađih kobilu (Jeffcott i Whitwell, 1973.), dok je postotak pobačaja blizanaca najmanji kod hladnokrvnih i arapskih kobilu (Byszewski i Gromnicka, 1994.). Zbog očekivanog ishoda blizanačke gravidnosti i vrlo loše prognoze za daljnju reproduktivnu sposobnost kobilu i

preživljavanje blizanaca od velike je važnosti rana dijagnostika blizanačke gravidnosti i pravovremena intervencija.

Spontana redukcija blizanaca prije fiksacije zametaka (16. dana nakon koncepcije) vrlo rijetko se događa, kao i rana embrionalna smrtnost u istom razdoblju (Ginther, 1989.a). Sam diameter i postotak rasta zametnih mjehurića od 11. do 16. dana slični su kao i kod gravidnosti s jednim ždrebetom. Velika nejednakost u veličini zametnih mjehurića može se javiti kao posljedična asinkrone ovulacije. Dijagnostika blizanačke gravidnosti prije fiksacije zametaka je teška i ovisi o iskustvu operatera, rezoluciji i jačini opreme (5 MHz), jačini monitora i drugim čimbenicima (Makek i sur., 1993., Csik i sur., 2007.). Diferencijalno dijagnostički treba misliti i na endometrijske ciste (Prvanović i sur., 2005.). Blizanačka gravidnost najlakše se rješava u ovoj fazi, dok još nije došlo do fiksacije zametaka, tako da se pod kontrolom UZV mehanički zgnječi jedan od blizanaca ili ga se gurne prema vrhu roga gdje nema uvjeta za fiksaciju (Pascos i sur., 1987., McKinnon i Rantanen, 1998.).

Nakon fiksacije zametaka otežana je dijagnostika blizanačke gravidnosti osobito ako su fiksirani jednostrano. Naime, od 17. do 21. dana nakon koncepcije ultrazvukom jedino se može uočiti prisuće tanke linije koja prolazi po sredini između neznatno povećanog zametnog mjehura. Stoga je vrlo lako zamijeniti jednostrano fiksirane blizance stare 17 do 20 dana s jednim embrijem starim 28 do 30 dana (Woods i Hallowell, 1993.). Između 22. do 60.

dana gravidnosti postupno se sve jasnije može uočiti prisuće više fetusa, budući da su jasnije izraženi pupčani tračci obiju blizanaca, srčana akcija te raspoznatljivi organi oba ploda koji uvelike olakšavaju diferencijaciju (McKinnon i sur., 1993.). Nakon 30. dana između dva alantokoriona razvija se zajednička membrana iz područja pripajanja, poznata kao blizanačka membrana koja nakon 100. dana gravidnosti, kad se oba fetusa ne mogu palpirati niti vidjeti transrektalnom ultrazvučnom pretragom, ima veliko dijagnostičko značenje (Ginther i Griffin, 1994.).

Ishod blizanačke gravidnosti nakon fiksacije zametaka ovisi o prirodi njihove fiksacije. U slučaju jednostrane fiksacije zametaka češće se javlja spontana postfiksacijska redukcija jednog od plodova. Unilateralna fiksacija češća je od bilateralne, a javlja se kao posljedica asinkrone ovulacije (Ginther, 1989.b). Ginther (1989.b) je proveo istraživanje na 31 kobili s blizanačkom gravidnošću te pokazao da se kod 71% kobila radilo o unilateralnoj, a samo kod 29% o bilateralnoj gravidnosti. Kod jednostrane fiksacije došlo je do spontane redukcije manjeg blizanca kod 22 od 22 kobile (100%) kada su zametni mjehurići bili različite veličine (>4 mm razlike u diametru). Kod zametnih mjehurića iste veličine do spontane redukcije jednog od blizanaca došlo je u 73% (kod 19 od 26 kobila). Na osnovu ovih rezultata pretpostavio je da veći mjehurić ometa i/ili onemogućuje unošenje hranjivih tvari u manji zametni mjehurić, jer je veći dio područja stijenke zametnog mjehura koji će biti reduciran pokrive-

no stijenkom prilagođenog zametka koji će preživjeti. Od 85% redukcija do 40. dana gravidnosti u slučaju jednostrano fiksiranih blizanaca, 59% redukcija se javilo između 17. i 20. dana, 27% između 21. i 30. dana, a 14% između 31. i 38. dana (Ginther, 1989.b).

Blizanačka placentacija ima veliku ulogu u tijeku i ishodu blizanačke gravidnosti, a podijeljena je u tri morfološke grupe ovisno o smještaju koriona unutar maternice. Najčešće se javlja tip A blizanačke gravidnosti kod kojeg jedan fetus zauzima jedan maternični rog i veći dio tijela maternice (68% cjelokupne, funkcionalne površine), dok drugi blizanac zauzima jedan rog i mali dio prilagođenog tijela maternice. Na mjestu gdje se korioni dodiruju postoji različita mogućnost invaginacije manjeg koriona u alantoisnu šupljinu većeg fetusa. Ovakva gravidnost najčešće završava pobačajem ili preranim porodom jednog ili oba ploda i to između 3. i 9. mjeseca gravidnosti. Tip B je oblik blizanačke gravidnosti kod koje su oba fetusa slične veličine, zauzimaju jedan rog i polovicu tijela maternice te se najčešće oždrijebe živi. Tip C je oblik placentacije u kojem se očituje velika nejednakost između površina dvaju koriona. Manji plod zauzima samo jedan rog maternice, rano ugiba i biva mumificiran, dok se drugi porodi živ i ima velike prilike za preživljavanjem (Jeffcott i Whitwell, 1973.).

Metode koje se primjenjuju u svrhu uklanjanja jednog od blizanaca nakon fiksacije zametaka su energetska dijeta kobile (Merkt i sur., 1982.), ultrazvučna transvaginalna aspiracija jednog zametka (Bracher i sur., 1993.), transab-

dominalna intrakardijalna aplikacija KCl u srce jednog od plodova te u kasnijim fazama gravidnosti ultrazvučna transabdominalna aspiracija jednog od blizanaca (Rantanen i Kincaid, 1988.).

Prikaz slučaja

U lipnju 2007. godine u Kliniku za porodništvo i reprodukciju Veterinarskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu dovedena je trakenerska kobilica, stara 14 godina koja je bila pripuštena prije 47 dana. Sadašnji vlasnik kobilicu je kupio prije 4 godine zbog „dobrog rodovnika“. Kobilica je više puta pripuštena tijekom dvije pripusne sezone od kada boravi kod sadašnjeg vlasnika, no nije ostala gravidna. Tijekom rasplodne sezone 2006. kobilica je koncipirala, no pobacila je blizance u 8. mjesecu gravidnosti. Nakon zadnjeg pripusta kobilica je rektalno i ultrazvučno pregledana na gravidnost prije tjedan dana i dijagnosticirana je blizanačka gravidnost. Zbog vrijednosti kobile i nakon upoznavanja

vlasnika s mogućim ishodom gravidnosti te mogućnostima redukcije blizanačke trudnoće u ovoj fazi gravidnosti, vlasnik se odlučio i pristao na postupak ultrazvučne transvaginalne aspiracije jednog od blizanaca.

Po dolasku u Kliniku kobilica je pregledana vaginalno, rektalno i ultrazvučno te je uzeta krv za hematologiju, osnovne biokemijske pokazatelje i određivanje razine progesterona u serumu. Ultrazvučni pregled i potvrdu dijagnoze blizanačke gravidnosti izvršili smo s pomoću transrektalne multifrekventne linerne sonde od 3 do 7,5 MHz-a (ultrazvučni aparat SonoVet 2000, Medison, USA). Nakon toga još smo jednom izvršili ultrazvučni pregled s pomoću transvaginalne sektorske sonde od 5 i 7,5 MHz (ultrazvučni aparat Aquila, Pie Medical, Nizozemska) da bismo odredili točan položaj plodova unutar materničnog tijela i rogova maternice.

Potvrdili smo bilateralnu blizanačku gravidnost. Jedan je plod bio smješten u lijevom rogu i većem dijelu tijela maternice, dok je drugi blizanac bio u desnom rogu i u blizini bifurkacije materničnih rogova. Kod oba je ploda bila dobro vidljiva srčana akcija.

Sljedećeg dana izveli smo transvaginalnu ultrazvučnu aspiraciju jednog od blizanaca (transvaginal ultrasound-guided aspiration, TUGA). Punkciju i aspiraciju plodnih voda ploda koji je bio



Ehogram 1. Blizanačka gravidnost u kobile (47. dan nakon pripusta)



Slika 1. OPU sistem (Pie Medical) sa sektorskom sondom (5/7,5 MHz) i sustavom za uvođenje aspiracijske igle, povezanim s vakuum pumpom

smješten u desnom rogu i blizini bifurkacije materničnih rogova izveli smo uz pomoć OPU sistema (Pie Medical, Nizozemska) koji se sastoji od 3 komponente: ultrazvučnog aparata sa sektorskom sondom od 5 i 7,5 MHz, aspiracijske pumpe i sustava za uvođenje igle za aspiraciju (slika 1.). Kobilu smo prije OPU sedirali (0.25 ml/100 kg Domosedan®).

Hematološki i biokemijski pokazatelji bili su u dopuštenim granicama dan prije i dan nakon izvršene TUGA-e. Koncentracija progesterona u serumu određena je s pomoću brzog orijentacijskog progesteronskog testa Premate Equine® (Biomedica GmbH) prilikom prvog pregleda te zatim 2., 4., 8. i 60. dana nakon zahvata: iznosila je svaki put oko 16 ng/ml, što je fiziološka vrijednost za gravidne kobile.

Nakon čišćenja i dezinfekcije stidnice i perineuma, sustav za uvođenje igle (Terumo 18G) u kojem je također smještena i sonda ultrazvuka, uveli smo u vaginu i vrh sonde fiksirali kraniodorsalno s lijeve ili desne strane vanjske osi cerviksa, ovisno o tome koji smo maternični rog željeli punktirati. S pomoću druge ruke operater je *per rectum* fiksirao rog maternice na vrh sonde te se tako plod s plodnim voda-

ma mogao jasno vidjeti na ekranu i pod kontrolom ultrazvuka izvršiti aspiraciju plodnih voda jednog od blizanaca. Prilikom punkcije nastojali smo da s jednim ubodom igle u stijenku vagine aspiriramo što je moguće više plodnih voda, da bismo što manje oštetili endometriju.

Aspirat smo sakupljali u sterilnu 50 ml epruvetu (Falcon®) spojenu s vakuum pumpom da bi se osigurao stalni tlak prilikom punkcije.

Preoperativno kobila je dobila 1,1 mg/kg flunixin meglumina i.v. (Finadyne® Solution, Schering-Plough, Essex AH, Njemačka). To je nesteroidni antiupalni analgetik koji smo u ovom slučaju aplicirali preoperativno da bismo spriječili oslobađanje prostaglandina tijekom manipulacije s maternicom. Terapija je nastavljena tijekom narednih 4 dana (5 dana uzastopce).

Postoperativno je tijekom 5 uzastopnih dana dobivala po 8.000.000 i.j. penicilina i 5 g dihidrostreptomycin sulfata i.m.

Treći dan nakon izvršene TUGA-e kobilu smo ultrazvučno pregledali i ustanovili da nema ictusa srca kod ploda kojemu smo aspirirali plodne vode, dok je drugi plod pokazivao normalnu srčanu akciju.



Ehogram 2. Početak resorpcije jednog od blizanaca 3. dan nakon izvršene TUGA-e

Nakon izvršene kontrole koja je pokazala početak resorpcije jednog od blizanaca i normalnu srčanu akciju drugog ploda kobila je otpuštena s Klinike. Kobilu je narednog proljeća u terminu oždriježila vitalno žensko ždrijebe.

Rasprava

Blizanačka gravidnost je nepoželjno stanje u kobila i jedan je od najčešćih uzroka nezaraznih pobačaja u kobila (Prvanović i sur., 2003.). Rana dijagnostika blizanačke gravidnosti u kobila omogućuje pravovremenu intervenciju, bilo da se radi o prekidu takvog neželjenog oblika gravidnosti ili da se izvrši redukcija jednog od plodova, što drugom plodu daje priliku za normalan razvoj i povoljan ishod gravidnosti.

Blizance se može ultrazvučno utvrditi između 12. i 16. dana gravidnosti, no to je još faza izrazite mobilnosti zametaka te ih se stoga lako može i previdjeti (Ginther, 1989.a). Kod pravovremene

rane dijagnostike blizanačke gravidnosti kobila uspješnost manualnog gnječenja jednog od blizanaca tijekom faze mobilnosti zametka iznosi čak i do 90%, no nakon fiksacije zametaka njezina pouzdanost progresivno pada (Blanchard i sur., 2003.).

Ako je dijagnoza blizanaca postavljena nakon implantacije, ali prije 30. dana, gravidnost se može prekinuti primjenom PGF_{2α} te kobilu uvesti u ponovni ciklus ili pak izvršiti transvaginalnu ultrazvučnu aspiraciju jednog od plodova (Woods i Hallowell, 1993.).

S obzirom na specifičnosti fiziologije gravidnosti u kobila i tvorbu endometrijskih čašica nakon 36. dana gravidnosti, koje ostaju u funkciji sve od 90. do 130. dana, bez obzira na prisutće vitalnog ploda (Gordon, 1997.), metode za redukciju blizanaca nakon 37. dana prilično su nepouzdanе. Transvaginalna ultrazvučna aspiracija plodnih voda jednog od blizanaca (transvaginal ultrasound-guided aspiration, TUGA) u novije se vrijeme pokazala kao metoda izbora za redukciju jednog od blizanaca nakon tvorbe endometrijskih čašica. Uspjeh provođenja ove metode ovisi o različitim čimbenicima, kao što je smještaj embrija (unilateralno ili bilateralno), dužini trajanja gravidnosti i naravno o iskustvu doktora veterinarske medicine. MacPherson i Reimer (2000.) opisale su primjenu ove metode u 19 kobila s blizanačkom gravidnošću u razdoblju između 43. i 50. dana nakon koncepcije. Dvije od osam kobila (25%) kod kojih su blizanci bili smješteni bilateralno oždriježile su u terminu vitalno ždrijebe. U slučaju unilateralnog smještaja blizanaca uspješnost TUGA-e bila je niža: samo jedna od 11 kobila

(9%) se normalno oždrijebila. Kosec i Mrkun (2000.) opisali su transvaginalnu aspiraciju u 8 kobilu gravidnih između 22 i 48 dana. U šest kobilu se gravidnost nakon redukcije jednog od zametaka nastavila normalno, a kod dvije je došlo do resopcije i jednog i drugog ploda. Mari i sur. (2004.) izvršili su transvaginalnu ultrazvučnu aspiraciju blizanaca kod 20 kobilu gravidnih između 16 i 25 dana s uspjehom od 70% te je 14 kobilu oždrijebilo u terminu jedno vitalno ždrijebe. Isti su istraživači izvršili transvaginalnu aspiraciju blizanaca kod četiri kobile gravidne preko 40 dana, no sve su izgubile oba ploda: kod jedne su plodovi bili smješteni unilateralno, a kod tri bilateralno.

Druge metode koje se primjenjuju u svrhu uklanjanja jednog od zametaka su energetska dijeta kobile, transabdominalna intrakardijalna aplikacija KCl u srce jednog od plodova te u kasnijim fazama gravidnosti (nakon 100. dana) ultrazvučna transabdominalna aspiracija jednog od blizanaca, no one su se u praksi pokazale manje uspješnim od TUGA-e (MacPherson i Reimer, 2000.).

U radu je opisan slučaj uspješne aspiracije jednog od blizanaca 48. dana gestacije. Na povoljan ishod TUGA-e svakako je utjecala i činjenica da su plodovi bili smješteni svaki u svom rogu (bilateralno). Uklonjen je blizanac koji je bio prognostički lošije smješten, u blizini bifurkacije materničnih rogova. Nakon učinjene TUGA-e drugi zametak se dalje pravilno razvijao i kobilu je u terminu oždrijebila zdravo žensko ždrijebe.

Zaključak

Rana ultrazvučna dijagnostika ždrebosti pruža mogućnost detekcije i pravovremene intervencije u slučaju blizanačke gravidnosti te na taj način osigurava pozitivan ishod ovog riskantnog oblika gravidnosti kobilu.

Transvaginalna ultrazvučna aspiracija jednog od blizanaca je metoda kojom se može uspješno ukloniti jedan od plodova između 30. i 50. dana gravidnosti, osobito u slučaju bilateralnog smještaja plodova, što u velikom broju slučajeva omogućava nesmetan razvoj do termina ždrijebljenja drugog ploda.

Sažetak

Blizanačka gravidnost kobilu je ozbiljan problem koji najčešće završava ranom embrionalnom smrtnosti, pobačajem, preranim porodom ili rađanjem mrtve, slabe i deformirane ždrebadi. Rana ultrazvučna dijagnostika blizanačke gravidnosti pruža mogućnost pravovremene intervencije i na taj način osigurava pozitivan ishod ovog riskantnog oblika graviditeta.

U radu je opisan slučaj uspješne transvaginalne ultrazvučne aspiracije (TUGA) jednog od blizanaca, 48. dana gestacije, kod kobile trakenerske pasmine stare 14 godina. Punkciju i aspiraciju plodnih voda izveli smo uz pomoć OPU sistema (Pie Medical, Nizozemska) koji se sastoji od 3 komponente: ultrazvučnog aparata sa sektorskom sondom od 5 i 7,5 MHz, aspiracijske pumpe i sustava za uvođenje igle za aspiraciju (Terumo 18G). Kobilu smo prije OPU sedirali (0.25 ml/100 kg

Domosedan®). Preoperativno i postoperativno tijekom 5 dana kobila je dobila 1,1 mg/kg flunixin meglumina i.v. (Finadyne® Solution, Schering-Plough, Essex AH, Njemačka) te 8.000.000 i.j. penicilina i 5 g dihidrostreptomycin sulfata i.m. Treći dan nakon izvršene TUGA-e kobilu smo ultrazvučno pregledali i ustanovili da nema ictusa srca kod ploda kojemu smo aspirirali plodne vode, dok je drugi plod pokazivao normalnu srčanu akciju. Kobila je u terminu oždrijebila vitalno žensko ždrijebe.

Transvaginalna ultrazvučna aspiracija jednog od blizanaca pokazala se kao metoda kojom se može uspješno ukloniti jedan od plodova između 30. i 50. dana gravidnosti, osobito u slučaju bilateralnog smještaja plodova, što u velikom broju slučajeva omogućava nesmetan razvoj do termina ždrijebljenja drugog ploda.

Literatura

1. BLANCHARD, T. L., D. D. VARNER, J. SCHUMACHER, C. C. LOVE, S. P. BRINSKO and S. L. RIGBY (2003): Manual of Equine reproduction, Mosby, A Harcourt Health Sciences Company.
2. BRACHER, V., J. PARLEVLIET, M. PIETERSE, P. VOSS, P. WIEMER, M. TAVERNE and B. COLENBRANDER (1993): Transvaginal ultrasound-guided twin reduction in the mare. *Vet. Rec.* 133, 478-479.
3. BYSZEWSKI, W. and E. GROMNICKA (1994): Results of Reproduction of Mares in the State Horse Stud Farms in 1983-1992. *Med Weter* 50, 493-495.
4. CSIK, G., Z. MAKEK, T. DOBRANIĆ, M. SAMARDŽIJA, NIKICA PRVANOVIĆ i IVA GETZ (2007): Dijagnostika gravidnosti kobila transrektalnom ultrazvučnom pretragom. *Veterinarska stanica* 38 (5), 289-296.
5. GILES, R., J. DONAHUE, C. HONG, P. TUTTLE, M. PETRITES-MURPHY, K. POONACHA, A. ROBERTS, R. TRAMONTIN, B. SMITH and T. SWERCZEK (1993): Causes of abortion, stillbirth, and perinatal death in horses: 3527 cases (1986-1991). *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 8, 1170-1175.
6. GINTHER, O. J. (1987): Relationships among number of days between ovulations, number of embryos and type of fixation in mares. *J. Equine. Vet. Sci.* 7, 82-88.
7. GINTHER, O. J. (1989a): Twin embryos in mares. I: From ovulation to fixation. *Equine Vet J* 21, 166-170.
8. GINTHER, O. J. (1989b): Twin embryos in mares. II: Post fixation embryo reduction. *Equine Vet J* 21, 171-174.
9. GINTHER, O. J. and P. G. GRIFFIN (1994): Natural Outcome and Ultrasonic Identification of Equine Fetal Twins. *Theriogenology* 41, 1193-1199.
10. GORDON, I. (1997): Physiology and Endocrinology of Early Pregnancy. In: *Controlled reproduction in Horses, Deer and Camelids*. CAB International, UK.
11. JEFFCOTT, L. B. and K. WHITWELL (1973): Twinning as a cause of foetal and neonatal loss in the Thoroughbred mare. *J Comp Pathol* 83, 91-106.
12. KOSEC, M. and J. MRKUN (2000): Ultrasound guided surgical reduction of twin pregnancies in the horse up to the 46th day of pregnancy. *Dtsch Tierarztl Wochenschr.* 107, 139-141.
13. MACPHERSON, M. L. and J. M. REIMER (2000): Twin reduction in the mare: current options. *Anim. Reprod. Sci.* 60-61, 233-244.
14. MAKEK, Z., M. HERAK, M. CERGOJ, A. TOMAŠKOVIĆ, D. GEREŠ, M. SUKALIĆ, I. GECEG, B. PREMZL i IVA BARAC (1993): Dijagnostika rane gravidnosti kobila transrektalnom ultrazvučnom pretragom. *Stočarstvo* 47, 353-359.
15. MARI, G., E. IACONO, B. MERLO and C. CASTAGNETTI (2004): Reduction of

- Twin Pregnancy in the Mare by Transvaginal Ultrasound-Guided Aspiration. *Reprod. in Dom. Anim.* 39, 434-437.
16. MCKINNON, A. O., J. L. VOSS, E. L. SQUIRES and E. M. CARNEVALE (1993): Diagnostic Ultrasonography. In: MCKINNON A. O. and J. L. VOSS (Eds.): *Equine Reproduction*. Lea & Febiger, Philadelphia, London, 266-302.
17. MCKINNON, A. O. and N. RANTANEN (1998): Twins. In: RANTANEN, N. and A. O. MCKINNON: *Equine Diagnostic Ultrasonography*. Williams & Wilkins, Baltimore, MD, 451-156.
18. MERKT, H., S. JUNGnickel and E. KLUG (1982): Reduction of early twin pregnancy to a single pregnancy in the mare by dietetic means, *J. Reprod. Fert.* Suppl. 32, 451-452.
19. PASCOE, D. R., R. R. PASCOE, J. P. HUGHES, G. H. STABENFELDT and H. KINDAHL (1987): Comparison of two techniques and three hormone therapies for management of twin conceptuses by manual embryonic reduction. *J Reprod Fertil Suppl.* 35, 701-702.
20. PROHL, V. U., W. BUSCH and H. SCHUETZLER (1990): Studies on how to step up PMSG formation in mare by induction of superovulation and twin pregnancy. *Monatshefte Fuer Veterinaermedizin* 45, 764-768.
21. PRVANOVIĆ, N., D. ALAGIĆ, A. TOMAŠKOVIĆ, Z. MAKEK, T. DOBRANIĆ, T. KARADJOLE and J. GRIZELJ (2003): Zwillingsträchtigkeit bei Holsteinerstuten. *Tierarztl. Umschau* 58, 419-422.
22. PRVANOVIĆ, N., Z. MAKEK, A. TOMAŠKOVIĆ, I. GETZ i J. GRIZELJ (2005): Fiziologija reprodukcije kobila. Interna skripta. Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu.
23. RANTANEN, N. and B. KINCAID (1988): Ultrasound guided fetal cardiac puncture: a method of twin reduction in the mare. *Proc. Ann. Conv. Assoc. Am. Equine Pract.*, San Diego, 173-179.
24. WOODS, G. L. and A. L. HALLOWELL (1993): Management of twin embryos and twin fetuses in the mare. In: MCKINNON, A. O. and J. L. VOSS: *Equine reproduction*. Lea & Febiger, Philadelphia, London, 532-535.

Twin Pregnancy in Mare – case study

Iva GETZ, DVM, Ph.D., Assistant Professor, Nikica PRVANOVIĆ, DVM, Ph.D. Assistant Professor, Tomislav DOBRANIĆ, DVM, Ph.D., Full Professor, Tugomir KARADJOLE, DVM, Ph.D. Assistant Professor, Zdenko MAKEK, DVM, Ph.D., Full Professor, Nino MAČEŠIĆ, DVM, Junior Researcher, Faculty of Veterinary Medicine, Zagreb; Ana MAGOČI, DVM

Twin pregnancy is a serious problem in equine practice, because twinning usually causes abortion, stillbirth, perinatal death or the delivery of weak and deformed foals. Early trans-rectal ultrasonographic diagnosis allows for prompt treatment of twin pregnancies. The earlier the diagnosis is made, the better are the results from the treatment which may be given. Endometrial cups are formed after Day 36 and remain

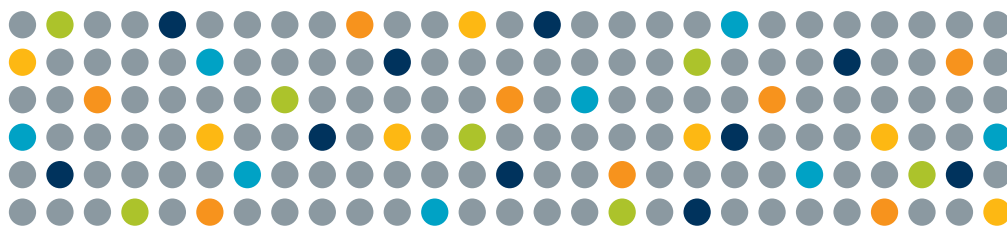
functional until approximately Day 90 to 130 of gestation and mares whose pregnancies are lost will frequently not cycle for all that time. Therefore, the management of equine twin pregnancy after the establishment of endometrial cups is questionable.

In this case study the efficiency of trans-vaginal ultrasound-guided aspiration (TUGA) is described in a 14-year old Trakener mare, which was per-

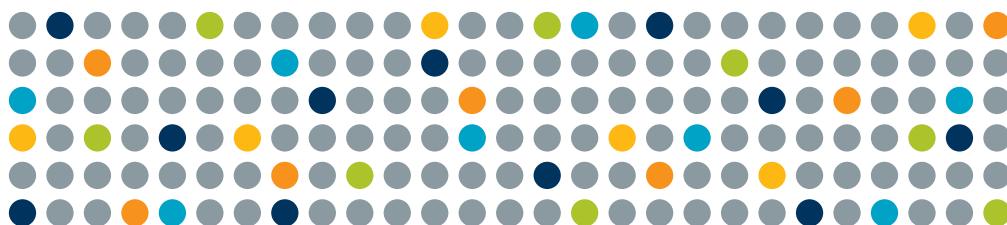
formed on the 48th day of bilateral twin pregnancy. For the reduction of twin, lying in the right horn nearby uterine bifurcation, we used an OPU system (Pie Medical, the Netherlands) consisting of an ultrasound scanner with a sector 5/7.5 MHz transducer attached to an aspiration pump and ovum pick-up needle (Terumo 18G) guidance system. For the sedation of the mare we used 0.25 ml/100kg Domosedan® I.V. Before and after the procedure the mare was treated with 1.1 mg/kg flunixin meglumin I.V. (Finadyne® Solution, Schering-Plough, Essex AH, Germany) and 8.000.000 I.U. Penicillin and 5 g

Dihydrostreptomycin sulphate I.M. for 5 consecutive days. On the 3rd day after TUGA the mare was re-examined and no heart activity was detected in reduced twin, while the other twin showed normal heart action. The ongoing pregnancy was completed in term with the delivery of live foal.

The results of this case study show that TUGA is a safe procedure that can be considered as an important tool for twin reduction between Day 30 and 50 of pregnancy, especially for bilateral twins and in most cases allows development of the remaining foetus to the term.



Sretan Božić i Nova godina



VETERINA

*Tradicija, iskustvo i znanje
u veterinarskom poslovanju
temeljeno na stogodišnjoj povijesti*

Svetonedeljska 2 · Kalinovica
10436 Rakov Potok, Hrvatska
Tel.: +385 1 33 88 609

info@veterina.hr
www.veterina.hr

Dijagnostika i terapijski protokol *helicobacter* gastritisa u psa i čovjeka

Dalibor Potočnjak i Sonja Tica



Uvod

Bolesti probavnog sustava jedan su od najčešćih razloga zbog kojeg se vlasnici pasa obraćaju za savjet veterinaru. Probavni trakt je vrlo složen organski sustav koji ima neobičnu ulogu jer u isto vrijeme djeluje kao barijera i kao absorptivna površina. Od mnogobrojnih simptoma bolesti probavnog trakta vlasnici pasa najčešće dolaze s kliničkom slikom koja upućuje na gastritis. Znamo da je puno čimbenika koji uzrokuju gastritis, kao i to da je jedan od uzroka kroničnog gastritisa u ljudi i životinja bakterija iz roda *Helicobacter*.

Helicobacter pylori ima veliku važnost ne samo za kliničku medicinu nego i za javno zdravstvo. Radi se o, vjerojatno, najčešćoj infekciji na svijetu koja je uzročno povezana s jednom od kronične bolesti najviše prevalencije, a to je ulkusna bolest. Iako je već desetljećima poznata prisutnost spiralnih bakterija

u sluznici želuca životinja i ljudi, tek je ranih osamdesetih godina dokazano da je bakterija *Helicobacter pylori* uzročnik kroničnog gastritisa, želučanog ulkusa te MALT limfoma u ljudi.

Nažalost, u domaćih životinja situacija nije tako jasna. Premda je potpuno jasno opisana visoka učestalost infekcije želuca različitim mikroorganizmima sličnim *Helicobacteru* u pasa, njihovo pravo značenje još nije znanstveno razjašnjeno. Činjenica da ne znamo dovoljno o etiopatogenezi *Helicobacter* vrsta, a samim tim ni o učinkovitoj terapiji i eradikaciji bolesti daje nam osnovu za daljnja brojna istraživanja na tom području.

Dijagnostika

Dijagnostički testovi za želučane *Helicobacter* spp. mogu biti invazivni

Dr. sc. Dalibor POTOČNJAK, dr. vet. med., izvanredni profesor, Veterinarski fakultet, Zagreb; Sonja TICA, dr. vet. med., Veterinarska stanica Sv. I. Zelina

i neinvazivni. Za invazivne testove (stanične kulture, histopatologija, razmazi, ureaza test, elektronska mikroskopija i PCR) potreban nam je uzorak biopsata dobiven tijekom endoskopske pretrage želuca. Neinvazivni testovi (serologija, urea izdisajni i krvni test) ne trebaju biopsijski uzorak pa tako ni opću anesteziju (Strauss-Ayali i Simpson, 1999., Neiger, 2008.).

Invazivni testovi

Stanične kulture. Uzorak za izolaciju *H. pylori* je biopsijski materijal sluznice želuca. Zbog nejednolike kolonizacije sluznice treba uzeti najmanje dva uzorka (po jedan iz antruma i korpusa). Osobito je važno uvijek uzeti uzorak sa sluznice korpusa želuca pri kontroli eradikacije nakon liječenja u koje je uključen i blokator protonske pumpe, jer se u tom slučaju eventualno zaostale bakterije povlače iz antruma u područje korpusa (Kalenić i sur., 1996.).

Uzorak se usitni i lagano homogenizira te se pripremi mikroskopski preparat, test ureaze i kultura. Podloge za kulturu su čokoladni, moždanosrčani ili brucela-agar uz 5 - 7% konjske ili ovčje krvi. Preporučuje se uvijek uporabiti najmanje dvije ploče, od kojih je jedna neselektivna, a druga ima u sebi selektivni antibiotski dodatak. Nakon inkubacije u mikroaerobnoj atmosferi i visokoj vlažnosti, ploče se očitavaju četvrtog do sedmog dana. Radi li se o kulturi nakon antimikrobnog liječenja, tada se ploče inkubiraju 10 – 14 dana prije proglašavanja nalaza negativnim. Identifikacija je jednostavna: uz tipičnu

makromorfologiju (nježne, sitne, prozirne i sjajne kolonije) i mikromorfologiju (gram-negativni kraći i dulji, zavinuti ili ravni štapići te kokoidni i različiti bizarni oblici u starijoj kulturi), pozitivan mora biti test ureaze, katalaze i oksidaze (Glupczynski, 1995., Kalenić i sur., 1996.).

Histopatologija. Histološki pregled želuca je brza i pouzdana metoda za određivanje prisutnosti *H. pylori* i morfoloških karakteristika gastritisa. Osjetljivost i specifičnost histološke diagnostike *H. pylori* je oko 90% u usporedbi s drugim metodama (serologija, kultura) (Sipponen, 1995.).

Ako je broj bakterija velik, može se prepoznati u rutinski obojenim preparatima. Obično jednolike, sitne, lagano zakrivljene bakterije (slične zarezu ili slovu 'S') oblažu epitel, ili se vide u sluzi iznad epitela, ili pak u dubini. Kad je količina bakterija malena i ako želimo sa sigurnošću razlikovati *H. pylori* od drugih bakterija (koje mogu biti prisutne kod hipoklorhidrije, ulkusa ili karcinoma želuca), upotrebljava se jedna od sljedećih histokemijskih metoda: Warthin-Starry, Gimenez, 'polovični Gram' ili 2% Giemsa (Kalenić i sur., 1996.). Pomoću histološkog pregleda ne može se točno odrediti o kojoj se vrsti *Helicobacter* organizma radi, ali poznavajući morfološku razliku između *H. pylori* i *H. helmanii* (vrste koje se javljaju u čovjeka) može se sa sigurnošću pretpostaviti o kojoj se vrsti radi. *H. helmanii* su veće bakterije s više spiralnih zavoja od *H. pylori* (Jenkins i Bassette, 1997.).

Za pravilnu histološku procijenu prisutnosti *H. pylori* kao i određivanje

tipa gastritisa potrebno je uzeti više komadića sluznice želuca. Rutinski se uzimaju četiri uzorka sluznice, po dva iz korpusa i antruma, i to s prednje i stražnje stijenke. Iako postoje brojne klasifikacije kroničnog gastritisa, uz *H. pylori* se najčešće veže najnoviji sidnejski sustav (Sydney system- SS) koji uključuje histološku i endoskopsku dijagnostiku (Misiewicz, 1991., Kalenić i sur., 1996.). Histološka je analiza temeljena na tri elementa: 1. etiologija, 2. topografija i 3. morfolologija. Histomorfološki se promjene antruma i korpusa dijele na tri glavne kategorije: a) akutni gastritis, b) kronični gastritis, c) posebni oblici gastritisa. Varijable unutar morfoloških kriterija SS sustav definira kao: 1. nema promjena, 2. male promjene, 3. srednje srednje, 4. izražene promjene, a to se odnosi na tip upalnog infiltrata, zatim na atrofiju, na intestinalnu metaplaziju te na *H. pylori*. Topografska se klasifikacija odnosi na dio ili dijelove želuca koji pokazuju endoskopske promjene. Etiološka se klasifikacija povezuje s *H. pylori* ili s drugim uzrocima ili je idiopatska (Kalenić i sur., 1996.).

Zbog raznolikosti histopatoloških kriterija u pojedinim istraživanjima i u nedostatku standardizacije sustava za klasificiranje promjena histopatološkog nalaza želuca u pasa, teško je uspoređivati rezultate različitih istraživanja i određivanje tipa gastritisa u pasa (Strauss-Ayali i Simpson, 1999.).

Razmazi. *Helicobacter* slični organizmi bojani metodom po Gramu ili May-Grunwald-Giemsa metodom se vrlo dobro vide na predmetnom stakalcu. Ovo je osjetljiva i vrlo lako izvediva metoda (Strauss-Ayali i Simpson, 1999.).

Ureaza test. *Helicobacter pylori* je bakterija koja proizvodi velike količine ekstracelularne ureaze. Stoga je moguće u biopsijskom materijalu želučane sluznice dokazati prisutnost ureaze jednostavnom metodom uranjanja biopsata u podlogu koja sadrži ureju i indikator osjetljiv na promjenu pH (Kalenić i sur., 1996., Neiger, 2008.). Pri niskim pH vrijednostima bakterijska ureaza razlaže ureju na amonijak i bikarbonate koji lokalno povišuju pH. Biopsat možemo uroniti u podlogu koja sadrži ureju i fenolno crvenilo kao pH indikator. Ako je ureaza prisutna, enzim će razgraditi ureju i pH će se promjena očitovati promjenom boje podloge od narančasto crvene do ružičaste (Strauss-Ayali i Simpson, 1999., Neiger, 2008.). Postoje komercijalni pripravci ureje u malim epruvetama, jednostavni za čuvanje, koje inokulira endoskopičar i u kojima se reakcija razgradnje ureje može vidjeti na sobnoj temperaturi u vremenu od 30 minuta do 4 sata. U tom vremenu od svih poznatih bakterija u želucu samo *H. pylori* i *H. helmanii* dovode do razgradnje ureje pa je test visoko specifičan (Kalenić i sur., 1996.).

Elektronskim mikroskopom možemo razlikovati vrste iz roda *Helicobacter* poznavajući njihove morfološke karakteristike. Nedavno istraživanje je dokazalo pet vrsta *Helicobacter* bakterija u pasa koristeći elektronski mikroskop. Drugo istraživanje upozorava na mogućnost nestanka nekih morfoloških karakteristika specifičnih za pojedinu vrstu, primjerice periplazmatske fibrile, što smanjuje mogućnost razlikovanja pojedinih vrsta iz roda *Helicobacter*. Elektronska mikroskopija je vrlo

složena i skupa metoda pa se trenutno koristi samo u određenim znanstvenim istraživanjima (Strauss-Ayali i Simpson, 1999., Neiger, 2008.).

Polimeraza lančanom reakcijom moguće je otkriti prisutnost nukleinskih kiselina *H. pylori* u biopsatu želučane sluznice psa (Neiger, 2008.). Objavljeni su radovi u kojima je pokazana mogućnost dokaza *H. pylori* navedenom metodom u stolici, želučanom soku, slini i zubnom plaku čovjeka (Kalenić i sur., 1996.).

Helicobacter pylori biokemijski je homogen, no antigeno vrlo raznolik pa se ne radi serotipizacija. Otkrivanjem polimorfizma duljine restrikcijskih fragmenata tehnikama koje se temelje na lančanoj reakciji polimeraze, mogu se isto tako tipizirati sojevi i dokazati različiti sojevi te tipovi i suptipovi unutar istog soja. Radi se i *fingerprinting* čitave kromosomske DNA pa je moguće pokazati veliku heterogenost sojeva izoliranih od različitih bolesnika, no i homogenost izolata od istog bolesnika (Kalenić i sur., 1996.).

Kao i za druga istraživanja, potrebno je biopsat uzeti s nekoliko različitih mjesta u želucu, pošto naseljenost sluznice želuca *Helicobacter* bakterijama nije ravnomjerna (Neiger i sur., 1999., Strauss-Ayali i Simpson, 1999.).

Neinvazivni testovi

Serologija. Prisutnost specifičnih protutijela za *H. pylori* u serumu pacijenata predstavlja osnovu primjene neinvazivne dijagnostike serološkim metodama. Zahvaljujući imunološkoj

reaktivnosti zaraženog domaćina stvaraju se specifična protutijela IgA i IgG za bakterijske antigene (Kalenić i sur., 1996., Neiger, 2008.).

IgA protutijela vežu se za površinu *H. pylori* i sprječavaju bakterijsku adheziju za stanice. Mehanizam takvog djelovanja nije dovoljno učinkovit u sprečavanju širenja infekcije. Osjetljivost testova za detekciju specifičnih IgA protutijela je 60 i 80%. Specifična IgG protutijela najčešće su prisutna u serumima pacijenata. Pri tome se uvijek stvaraju potklase IgG1, IgG2 i IgG4, a nikad IgG3. Testovi za detekciju specifičnih IgG protutijela visoke su osjetljivosti (94%) i specifičnosti (98%), slično PCR metodi, u odnosu na test ureaze (88%) i izolaciju bakterija (70%) (Kalenić i sur., 1996.).

Postupci koji se vrše u serološkoj dijagnostici infekcija *H. Pylori* su različiti: aglutinacija i reakcija vezanja komplementa, pasivna hemaglutinacija i imuno-blot testovi. Danas se zbog visoke osjetljivosti, specifičnosti i jednostavne primjene većinom u rutinskoj dijagnostici i istraživanjima o *H. pylori* upotrebljavaju imunoenzimni testovi (ELISA). Broj dostupnih komercijalnih testova svakim danom je sve veći, a razlikuju se u osjetljivosti i specifičnosti, načinu i vremenu izvođenja, potrebnoj aparaturi te svrsi uporabe: preliminarna metoda probira (screening) prije endoskopije, dijagnostika infekcije, prosudba terapije (Kalenić i sur., 1996.).

U serološkoj je dijagnostici od osobitog značenja izbor antigena. Dobar bi antigen trebao posjedovati dijelove koji su zajednički različitim sojevima *H. pylori* (velika osjetljivost). S druge strane, odabrani antigeni ne smiju sadržavati

dijelove slične drugim vrstama bakterija (npr. *Campylobacter*) kako bi se križne reakcije svele na minimum, a zadržala visoka specifičnost. Antigeni pripravljeni upotrebljavani u ELISA testovima su različiti od kompletne bakterijske stanice ili njezinih dijelova dobivenih različitim i složenim kemijskim ili fizikalnim postupcima. Serološke metode imaju određeno mjesto i značenje u dijagnostici infekcija *Helicobacter pylori* i njihovoj eradikaciji kao i epidemiološkim studijama (Kalenić i sur., 1996.).

Urea izdisajni i krvni test. Druga je neinvazivna metoda dokaz prisutnosti ureaze u želucu bolesnika. Pacijent popije ureju u kojoj je ^{12}C zamijenjen izotopima ^{13}C ili ^{14}C . Ako je *Helicobacter pylori* prisutan u želucu, njegova će ureaza razgraditi ureju na bikarbonatni i amonijev ion, koji se resorbiraju i nađu u krvotoku. Bikarbonat će se razgraditi i oslobodit će se CO_2 koji se zatim nađe u izdahnutom zraku. U ureji se i dušikov atom može zamijeniti izotopom (^{13}N). Ako u želucu nema ureaze, ureja se resorbira i izluči urinom. Moguće je dakle mjeriti izotop ugljika u krvi ili izdahnutom zraku, odnosno potražiti komplementarne vrijednosti u urinu ako se ureja nije razgradila, ili se pak može u urinu tražiti izotop dušika. Zasada su dobro standardizirane samo metode mjerenja ugljikova izotopa u izdahnutom zraku (Kalenić i sur., 1996.).

^{13}C – test

^{13}C je prirodan, stabilan ugljikov izotop. Nakon razgradnje ureje u želucu, u izdahnutom zraku se mjeri omjer ^{12}C i

^{13}C , tako da količina zraka koji se šalje na ispitivanje nije bitna. Od bolesnika se prije davanja ureje uzima bazalni izdahnut zrak, a 30 minuta nakon uzimanja ureje drugi uzorak izdahnutog zraka te se uspoređuju vrijednosti ^{13}C prije i poslje uzimanja ureje. Test ima vrlo visoku osjetljivost i specifičnost, a glavna mu je zamjerka visoka cijena aparata za analizu - spektrofotometar mase (Kalenić i sur., 1996.).

^{14}C – test

Princip je testa posve isti kao i s ^{13}C -izotopom, samo što je ^{14}C radioaktivan izotop koji zrači β -zrake te se izdahnuti zrak analizira na β -brojaču. Zbog velike osjetljivosti testa treba izbjegavati razgradnju ureje u usnoj šupljini od strane oralnih bakterija te se ^{14}C može dati u kapsuli. Glavne su prednosti ovog testa u tome što je jeftin i brzo se izvodi, jer se ^{14}C može detektirati u samo nekoliko minuta. Jedini je nedostatak što je ^{14}C radioaktivan, ali doze zračenja koje se u ovom testu rabe su zanemarive (Kalenić i sur., 1996.).

Izvođenje testa u ljudi je vrlo jednostavno: bolesnik pojede obrok koji zadržava pražnjenje želuca, nakon toga popije označenu ureju, legne i okreće se s boka na bok kako bi se ureja jednoliko raširila po stijenci želuca te se nakon određenog vremena uzimaju uzorci izdahnutog zraka u kojima se traži ugljikov izotop (Kalenić i sur., 1996.).

U pasa se uzorci izdahnutog zraka prikupljaju pomoću posebno prilagođene maske za anesteziju, za koju je pričvršćen inhalacijski balon. Psi

dopustimo da napuni inhalacijski balon, a uzorci zraka se skupljaju kroz balon u poseban otvor pa u brizgalicu (Strauss-Ayali i Simpson, 1999.).

Znatna prednost ureja izdisajnog testa u odnosu na biopsiju je činjenica da se ureja jednoliko raspoređuje po želucu te zahvaća cjelokupnu sluznicu, za razliku od biopsije pomoću koje se mogu pregledati samo mali dijelovi sluznice. U kliničkoj praksi u humanoj i veterinarskoj gastroenterologiji ureja izdisajni test najčešće se upotrebljava za dokaz eradikacije jedan mjesec nakon završenog antimikrobnog liječenja (Kalenić i sur., 1996., Neiger, 2008.).

Terapijski protokol

Terapijski protokol u čovjeka

U humanoj medicini eradikacijska terapija se danas preporučuje svim bolesnicima s peptičkim ulkusom koji su inficirani s *Helicobacter pylori*. Današnja moderna terapija mora zadovoljavati ove osnovne uvjete: mora imati djelotvornost iznad 90%, malo nuspojava, nizak stupanj razvoja rezistencije bakterije, jednostavan i materijalno pristupačan terapijski režim. Trojna terapija bizmutom s dva antibiotika te s protusekretornim lijekom vrlo je djelotvorna, no negativne strane su joj komplicirani režim davanja te brojne nuspojave. Dvojna terapija omeprazolom i amoksicilinom, odnosno klaritromicinom je jednostavna i sigurna, no ima nižu djelotvornost. Vrlo su ohrabrujući rezultati jednotjedne trojne terapije omeprazolom, klaritromicinom i nitroimidazolom ili amoksicili-

nom pa bi ta terapija mogla u bliskoj budućnosti postati terapijom izbora (Vucelić, 1996.).

Početkom 90-tih godina publicirana su prva iskustva s terapijom koja je uključivala tri lijeka, i to bizmut, metronidazol i tetraciklin uz kasniji dodatak protusekretornog lijeka. Navedena je terapija bila visoko djelotvorna (90%), no učinke je smanjivalo nepridržavanje uputa o redovitom uzimanju lijeka te primarna rezistencija na metronidazol (Tytgat, 1994.). Jednotjedna terapija se pokazala jednako djelotvornom kao dvotjedna, a metronidazol se može zamijeniti klaritromicinom bez gubitka djelotvornosti (Thijs, 1994.).

Dvojna terapija omeprazolom i ampicilinom provođena je u nizu kliničkih pokusa s djelotvornošću oko 80%. Nešto povoljniji rezultati postignuti su kod jače izraženog gastritisa, želučanog ulkusa i u starijoj dobi. Dvojna terapija omeprazolom i klaritromicinom obećavala je mnogo, jer je klaritromicin najdjelotvorniji antibiotik protiv *H. pylori*. Omeprazol znatno mijenja farmakokinetiku klaritromicina u inficiranom želucu gdje se koncentracija antibiotika znatno povećava u antralnoj sluznici i sloju sluzi. Rezultati su se u kliničkim uvjetima kretali oko 80% eradikacije (Vucelić, 1996.).

Novije su studije u humanoj medicini pokazale da jednotjedna trojna terapija omeprazolom (2x20 mg), klaritromicinom (2x250 mg) i tinidazolom (2x500 mg) ili metronidazolom (2x400 mg) eradiciira infekciju *H. pylori* u više od 90% bolesnika. Zamjena metronidazola tetraciklinom rezultira značajnim smanjenjem djelotvornosti, dok je

amoksisilin (2x1 g) dobra alternativa nitroimidazolima. Izbor terapije u našim prilikama uvjetovan je odsutnošću nekih od navedenih lijekova na našem tržištu, gdje nema uvijek klaritromicina ni bizmuta (Vucelić, 1996.).

Terapijski protokol mora biti jednostavan i dobro podnošljiv kako bi ga bolesnik što lakše i u potpunosti proveo. Uspjeh eradikacije *Helicobacter pylori*, vrednovan strogim „intention-to-treat” kriterijima, mora biti viši od 80%. Preporuča se trojna terapija, ne duža od 7 dana. Kao protusekretorni lijek koristi se jedan od 3 inhibitora protonske pumpe: omeprazol, pantoprazol ili lansoprazol. Uz to se daju dva do tri antibiotika: amoksisilin, azitromicin/klaritromicin ili metronidazol/tinidazol. Zbog neuspjeha eradikacijske terapije i porasta broja rezistentnih sojeva *Helicobacter pylori* na antibiotske komponente dosadašnjih terapijskih protokola, traže se novi načini liječenja i novi djelotvorni lijekovi (Katičić i sur., 2002.).

Rezultati 7-, 10- i 14-dnevne terapije kombinacijom omeprazola, amok-

sicilina i metronidazola, slabiji su od rezultata postignutih kombinacijom u kojoj je amoksisilin zamijenjen klaritromicinom. Kombinacija amoksisilina i metronidazola s pantoprazolom bila je djelotvornija od iste s omeprazolom, za razliku od kombinacije metronidazola i azitromicina koja je bila djelotvornija s omeprazolom (Katičić i sur., 2002.).

Prema preporukama Europske grupe za *Helicobacter pylori* (HP) infekciju, posebno se preporuča liječenje HP infekcije u svih HP pozitivnih bolesnika s ulkusima ili ulkusnim ožiljcima, a posebno u onih koji su iz tih ulkusa krvarili. Moderna europska i hrvatska terapija mora biti trojna i uvijek se sastojati od jakog protusekretornog lijeka (inhibitora protonske pumpe) i dva antibiotika. Liječenje traje 7 dana (tablica 1), a protusekretorni lijek se obično daje tijekom 14 dana (Katičić, 2005.).

Velika je većina gastroenterologa nastavljala protusekretornu terapiju dodatna 2-4 tjedna nakon završene eradikacijske terapije. Postoji međutim puno dokaza da gotovo svi ulkusi dvana-

Tablica 1. Hrvatska preporuka za liječenje HP infekcije u ljudi

Protusekretorni lijek (inhibitor protonske pumpe)

Predložene kombinacije antibiotika:

1. metronidazol (2x400-500mg) ili tinidazol (2x500 mg) i makrolidski antibiotik;
2. amoksisilin (2x1000mg) i makrolidski antibiotik;
3. amoksisilin (2x1000mg) i metronidazol (2x400-500mg) ili tinidazol (2x500 mg);

Makrolidski antibiotik:

- azitromicin 1 x 1000 mg - 3 dana
- klaritromicin 2 x 500 mg - 7 dana

Terapija se uzima 7 dana (osim azitromicina koji se uzima samo prva 3 dana).

esnika i želuca spontano zacijeljuju nakon eradikacije *H. pylori*. Stoga se sve više preporuča da se protusekretorna terapija nastavi nakon eradikacijske terapije samo u bolesnika s nepotpunim nestankom ulkusnih simptoma ili u onih koji paralelno moraju uzimati antiulkusne lijekove (Labenz i O'Morain, 1995.).

Eradikacija nesumnjivo zacijeljuje ulkuse dvanaesnika i želuca te sprječava recidive i komplikacije ulkusne bolesti. Epidemiološke i kliničke studije su pokazale vezu između infekcije *H. pylori* i želučanog adenokarcinoma te MALT limfoma. Postoje naznake u literaturi da eradikacija normalizira hiperproliferaciju želučanog epitela i smanjenu želučanu sekreciju askorbinske kiseline, no nema još sigurnih dokaza je li time smanjen rizik od karcinoma (Fraser, 1994.).

Mogućnost da eradikacija ima profilaktičko simptomatski učinak i da rješava neke bolesnike simptoma uz mogućnost da su neki bolesnici u remisiji ulkusne bolesti u trenutku pretraga govori da je potencijalna korist terapije infekcije veća od potencijalnog rizika, osobito ako se provodi jednostavni i sigurni terapijski režim (Labenz i O'Morain, 1995.).

Neka klinička istraživanja ukazala su da korištenje probiotika smanjuje popratne pojave uzrokovane tradicionalnom terapijom i poboljšavaju stupanj eradikacije (Egan i sur., 2007.).

Terapijski protokol u psa

Nedovoljno spoznaja o patogenosti bakterija iz roda *Helicobacter* dovodi

doktore veterinarske medicine u dilemu o tome terapiirati ili ignorirati spiralne bakterije koje su nađene u biopsatu pacijenata s gastritisom. Trenutno se smatra da treba provoditi onu terapiju koja se provodi u ljudi, ali samo u pasa kod kojih je u želucu biopsijom dokazana bakterija (Strauss-Ayali i Simpson, 1999.).

Terapija kombinacijom metronidazola (10 mg/kg), amoksicilina (20 mg/kg) i klaritromicina (7,5 mg/kg) peroralno dva puta dnevno tijekom 14 dana pokazala se učinkovitom. Mjesec dana nakon završene terapije ponovno moramo pregledati biopsat terapiраних pasa zbog moguće reinfekcije (Keneth, 2005.). Poznata je još jedna kombinacija antibiotika s dobrim rezultatima nakon završenog liječenja, a to su amoksicilin (20 mg/kg peroralno dva puta dnevno 14 dana), metronidazol (20 mg/kg peroralno dva puta dnevno 14 dana) i famotidin (0,5 mg/kg peroralno dva puta dnevno 14 dana) (Simpson, 2005.).

Poznata nam je još jedna djelotvorna kombinacija: amoksicilin (10 mg/kg dva puta dnevno), metronidazol (15 mg/kg jedan put dnevno) i sukralfat (0.5-1g svakih osam sati). Ova terapija je dosta komplicirana za vlasnike životinja pa se rijetko provodi. U pasa se često koristi trojna terapija amoksicilinom (10 mg/kg svakih osam sati), metronidazolom (14 mg/kg svakih osam sati) i bizmutom (0.2 ml/kg svakih šest sati) tijekom tri tjedna, koja daje jako dobre rezultate (Simpson, 2005.).

Kombinacija amoksicilina (20 mg/kg peroralno dva puta dnevno 14 dana), metronidazola (20 mg/kg peroralno dva puta dnevno 14 dana) i famotidin

(0,5 mg/kg peroralno dva puta dnevno 14 dana) se pokazala kao dobra terapija u pasa. Tri dana nakon prestanka terapije u šest pasa od osam više nije bilo *Helicobacter* bakterija. Međutim, nakon 28 dana po završetku antimikrobne terapije svi psi su ponovo bili inficirani. Znanstvene studije pokazuju da ona terapija koja u ljudi dovodi do eradicacije *Helicobacter* bakterija u želucu, u pasa izaziva supresiju s ponovnom reinfekcijom nakon prestanka terapije. Potrebna su još brojna istraživanja da bi se dobio odgovor treba li i kako liječiti pse s *Helicobacter* infekcijom, pogotovo one koji pokazuju simptome gastritisa (Strauss-Ayali i Simpson, 1999.).

Sažetak

U radu se opisuju temeljne dijagnostičke metode i terapija *Helicobacter* infekcije u psa i čovjeka. Dijagnostički testovi za želučane *Helicobacter* spp. mogu biti invazivni i neinvazivni. Neinvazivni testovi ne potrebuju biopsijski uzorak pa tako ni opću anesteziju, što ih za veterinarsku medicinu čini puno prihvatljivijom dijagnostičkom metodom. U humanoj medicini su do danas provedena brojna istraživanja o dijelovanju antibiotika na bakterije u želucu, tako da se eradikacijska terapija preporučuje svim bolesnicima s peptičkim ulkusom koji su inficirani s *Helicobacter pylori*. U veterinarskoj medicini je stvar malo drugačija. Zbog nedovoljne spoznaje o patogenosti bakterija iz roda *Helicobacter* u pasa, još se ne zna sa sigurnošću terapiirati ili ignorirati spiralne bakterije koje su

nađene u biopsatu pacijenata s gastritisom. Trenutno se smatra da treba provoditi onu terapiju koja se provodi u ljudi, ali samo u pasa kod kojih je biopsijom dokazana bakterija u želucu.

Literatura

- EGAN, B. J., M. KATIČIĆ, H. J. O'CONNOR and C. A. O'MORAIN (2007): Treatment of *Helicobacter pylori*. *Helicobacter* 12, 31-37.
- FRASER, A. G. (1994): Effect of eradication of *Helicobacter pylori* on gastric epithelial cell proliferation. *Aliment Pharmacol. Ther.* 8, 167-173.
- GLUPCZYNSKI, Y. (1995): Culture of *Helicobacter pylori* from gastric biopsies and antimicrobial susceptibility testing. In: LEE, A., MEGRAUD, F.: *Helicobacter pylori: techniques for clinical diagnosis and basic research*, Saunders Company Ltd, London, 17-32.
- JENKINS, C. C. and J. R. BASSETTE (1997): *Helicobacter* infection. *Small Animal Gastroenterology* 19, 267-279.
- KALENIĆ, S., M. DOMINIS i V. PRESEČKI (1996): Dijagnostika infekcija koje uzrokuje *Helicobacter pylori*. *Medicus* 5, 27-32.
- KATIČIĆ, M., M. PRSKALO, M. TIČAK, B. ŠABARIĆ, M. MARUŠIĆ, M. BANIĆ, M. KUJUNDŽIĆ, D. JELIĆ, M. KOZIĆ, S. MIHALJEVIĆ, N. MIĆUNOVIĆ, B. ŠKURLA i T. FILIPEC (2002): *Helicobacter pylori* – pregled terapijskih mogućnosti. *Liječnički vjesnik* 124, 72-78.
- KATIČIĆ, M. (2005): *Helicobacter pylori*-liječenje. *PLIVA zdravlje.hr*.
- KENETH, W. S. (2005): Diseases of the Stomach. In: Hall E. J., Simpson W. J., Williams D. A.: *BSAVA Manual of canine and feline gastroenterology*, Second edition, BSAVA, 167-168.
- LABENZ, J. and C. O'MORAIN (1995): Eradication. *Current Opinion in Gastroenterology* 11, 47-55.
- MISIEWIC, J. J. (1991): The Sydney sys-

- tem: a new classification of gastritis. *J Gastroenterol Hepatol.* 7, 207-215.
11. NEIGER, R., M. E. TSCHUDI and A. P. BURNENS (1999): Diagnosis and identification of gastric *Helicobacter* species by polymerase chain reaction in dogs. *Microbial. Ecol. Health Dis.* 11, 234-240.
 12. NEIGER, R. (2008): Diseases of the Stomach. In: STEINER J. M: *Small Animal Gastroenterology*, Schlütersche Hannover, 159-175.
 13. SIMPSON, K. W. (2005): Diseases of the stomach. In: ETTINGER S. J., FELDMAN E. C.: *Textbook of Veterinary Internal Medicine*, Volume 2, Sixth Edition, Elsevier Saunders, St. Louis, 1310-1331.
 14. SIPPONEN, P. (1995): *Helicobacter pylori*: a cohort phenomenon. *Am J Surg Pathol.* 19, 30-36.
 15. STRAUSS-AYALI, D. and K. W. SIMPSON (1999): Gastric *Helicobacter* infection in dogs. *Veterinary clinics of North America: Small animal practice* 29, 397-414.
 16. THIJS, J. C. (1994): Clarithromycin, an alternative o metronidazole in the therapy of *Helicobacter pylori* infection. *Aliment Pharmacol Ther.* 8, 131-134.
 17. TYTGAT, G. N. (1994): Treatments that impact favourably upon the eradication o *Helicobacter pylori* and ulcer recurrence. *Aliment Pharmacol Ther.* 8, 359-368.
 18. VUCELIĆ, B. (1996): Eradikacija *Helicobacter pylori*. *Medicus* 5, 33-36.

Diagnostic and therapeutic protocol in dog and human with *helicobacter* gastritis.

Dalibor POTOČNJAK, DVM, Ph.D., Associate Professor, Faculty of Veterinary Medicine Zagreb; Sonja TICA, DVM, Veterinary Station of the City of Sv. I. Zelina

This article describes some of the basic diagnostic methods and therapy protocols of the *Helicobacter* infections in dog and human. Diagnostic tests for the gastric *Helicobacter* spp. can be invasive and non-invasive. For non-invasive tests we do not need biopsy of the stomach and anaesthesia, which makes them much easier method in the veterinary medicine. In human medicine the therapy is suggested to every

patient with peptic ulcer infected with *Helicobacter pylori*. Because of the lack of knowledge about pathogenesis of the *Helicobacter* bacteria in dogs, we still do not know for sure to treat or to ignore spiral bacteria which are found in the stomach biopsy of the dogs with gastritis. It is considered that only dogs in which we proved the spiral bacteria by biopsy should be treated with the same therapy protocol as in humans.

Istraživanje *in vitro* osjetljivosti bakterije *Pseudomonas aeruginosa* na antipseudomonalne lijekove pomoću E-testa

Ana Maretić i Branka Šeol



Uvod

Pseudomonas aeruginosa (*P. aeruginosa*) uvjetno je patogena, oportunistička, slobodno živuća bakterija prisutna u vodi i tlu, na koži, mukoznim membranama i izmetu životinja (Greene, 1998.). Rijetko uzrokuje primarnu bolest, a česti je uzročnik sekundarnih infekcija. Predisponirajući čimbenici za infekciju su oštećenja tkiva (rane, opekline), oslabljenost zbog malignih procesa ili imunodefijencije, poremećena fiziološka mikroflora zbog terapije antimikrobnim lijekovima (Rorich i sur., 1983.).

Neke tipične bolesti koje uzrokuje bakterija *P. aeruginosa* su: prostatitis, cistitis, dermatitis, infekcija vanjskog slušnog kanala psa (Blue i Wooley, 1977., Mueller i Heusinger, 1994., Kiss i sur., 1997., Colombini i sur., 2000.), mastitis te pobačaj u goveda, pneu-

monija u činčila i nutrija pri farmskom uzgoju, pobačaj u kobilu, septikemija u ždrijebadi, infekcija rana u svih životinja te opekline u čovjeka.

P. aeruginosa je bakterija kojoj se pridaje veliki značaj u humanoj i veterinarskoj medicini, osobito zbog mnoge struke prirodne ili stečene rezistencije na uobičajene antimikrobne lijekove.

Budući da je vrsta *P. aeruginosa* ubikvitarna, odnosno prirodno okruženje su joj tlo, bacili, aktinomicete te plijesni, razvila je otpornost na brojne prirodne antibiotike. Rezistentna je na većinu antimikrobnih lijekova, koje ćemo u daljnjem tekstu zbog pojednostavljenja zvati samo antibiotici, koje rabimo u veterinarskoj praksi. S obzirom na sve učestaliju rezistenciju, liječenje pseudomonasnih infekcija najsigurnije je provesti na osnovi rezul-

Ana MARETIĆ, dr. vet. med.; dr. sc. Branka ŠEOL, dr. vet. med., izvanredna profesorica, Veterinarski fakultet Zagreb

tata dobivenih jednim od postupaka za određivanje osjetljivosti na antimikrobne (antipseudomonasne) lijekove.

Etiologija

P. aeruginosa je gram-negativna, aerobna, štapičasta bakterija iz porodice *Pseudomonadaceae* rod *Pseudomonas*. Živahno je pokretljiva, velika $0.5-0.8 \times 1.5-3.0 \mu\text{m}$. Posjeduje fimbrije, a pokatkad je okružena sluzavim slojem sličnim kapsuli. Raste na uobičajenim bakteriološkim hranjivim podlogama tvoreći plosnate sivkasto-plave kolonije s karakterističnim mirisom. Najbolje raste pri temperaturi od 37°C , no sposobna je za rast i na temperaturama do 42°C (Kenneth, 2008.). Sojevi ove bakterijske vrste tvore u vodi topljive pigmente: piocijanin, pioverdin, piorubin i piomelanin. Piocijanin, plavozele-ni pigment, jedinstven za ovu vrstu važan je u dijagnostici ove bakterijske vrste (Quinn i sur., 1994.). Vrsta *P. aeruginosa* tvori dva izvanstanična toksina, egzoenzim S i egzotoksin A (Kenneth, 2008.). Egzotoksin A koči sintezu bjelancevina u stanici domaćina i djeluje citotoksički. Većina sojeva vrste *P. aeruginosa* posjeduje fimbrije kojima se mogu pričvrstiti za tkivne stanice domaćina. Učinkovitost fagocita smanjuju lipopolisaharidi prisutni u stijenci bakterijske stanice, egzoenzim S i sluzavi sloj kojim su pojedini sojevi te bakterije obavijeni (Naglić i sur., 2005.).

Vrsta *P. aeruginosa* poznata je po svojoj rezistenciji na antibiotike, a prirođena otpornost posljedica je slabe propustljivosti citoplazmine membrane

te stvaranju biofilma. Samo manji broj antimikrobnih lijekova djeluje na bakteriju *P. aeruginosa*. To su fluorokinoloni (enrofloksacin, ciprofloksacin, marbofloksacin i drugi), cefalosporini treće generacije (cefotaksim, ceftizoksime, ceftriakson, ceftiofur, latamoksef, cefetamet, cefiksim, cefodoksime, cefoperazon, cefsulodin, ceftazidime) i cefalosporini četvrte generacije (cefipime, cefkvime i cefpirome), karbapenemi (imipenem) te aminoglikozidi (neomicin, kanamicin, amikacin, gentamicin, tobramicin, sisomicin i netilmicin). Bakteriju *P. aeruginosa* nalazimo u prirodi u biofilmu (biofilm formi) pričvršćenom na površini supstrata ili u obliku planktona kao jednostanični organizam koji se aktivno kreće (pliva) pomoću biča. Tendencija kolonizacije površina u biofilm formi čini stanice ove bakterije nepristupačnim terapijskim koncentracijama antibiotika. Biofilm forme su rezistentnije od planktonskih. Biofilm sadrži mukoidne egzopolisaharide, a sojevi koji ga tvore se nazivaju mukoidni sojevi (Kenneth, 2008.). Bakterijska vrsta *P. aeruginosa* među vodećim je bakterijama uzročnicima tzv. bolničkih infekcija, njihovo liječenje kao i iskorjenjivanje čini velike poteškoće zbog izražene rezistencije pseudomonasa na veliki broj antibiotika (Hsu i sur., 2005.).

Vrsta *P. aeruginosa* uzročnik je oportunističkih infekcija u imunokompromitiranih osoba. Značajan je uzročnik infekcija kod opekline te uzrokuje bolničke infekcije, pneumonije, destruktivne infekcije oka: keratitis i endoftalmitis, infekcije rana te alimentarne intoksikacije.

Rezistencija prema antimikrobnim lijekovima

Mehanizam rezistencije uključuje slabu propustljivost vanjske membrane te višestruku rezistenciju na lijekove (multipla rezistencija), „efluks pum-pu“, odnosno pojačano izbacivanje antibiotika iz stanice, promjenu ciljnog mjesta za antibiotik ili sintezu enzima koji razgrađuje ili modificira antibiotike. Prethodna izloženost antibioticima također često dovodi do višestruke rezistencije. Osim toga, vrsta *P. aeruginosa* sadrži i plazmid koji nosi informaciju o rezistenciji koja se transdukcijom i konjugacijom prenosi na ostale srodne ali i nesrodne bakterijske vrste (Kenneth, 2008.). Vrsta *P. aeruginosa* podjednako je otporna na ampicilin, prvu i drugu generaciju cefalosporina te eritromicin. Često je otporna i na streptomycin, tetraciklin, kloramfenikol, sulfonamide, nitrofurantoin te fluorokinolone (Aires i sur., 1999.). Fluorokinoloni, osobito enrofloksacin, se koriste 15-tak godina u veterinarskoj dermatologiji prvenstveno kod liječenja piodermije, otitis externa te otitis media (Ihrke i sur., 1999.). Iz skupine fluorokinolonskih antibiotika ciprofloksacin se pokazao najdjelotvornijim u liječenju infekcija uzrokovanih ovom bakterijom (Walker, 1999.).

U Hrvatskoj se bilježi povećana otpornost bakterije *P. aeruginosa* na imipenem i meropenem i to približno za 10%. Otpornost na karbapeneme u pojedinim većim bolnicama iznosi i više od 20%. Brza i točna dijagnostika ključna je u smanjenju nepotrebne primjene antibiotika. Liječenje prije nego li su

dobiveni rezultati bakteriološke pretrage i rezultati osjetljivosti, posebice kada je riječ o infekciji bakterijom *P. aeruginosa*, dovode do povećane rezistencije ove bakterije na inače djelotvorne antimikrobne lijekove. U borbi protiv širenja rezistencije na antibiotike ključnu ulogu imaju i znanstvena istraživanja kojima se otkrivaju novi mehanizmi rezistencije i mogućnosti njihovog nadvladavanja i kontrole (Tambić-Andrašević, 2007.).

E test

E test je kvantitativna metoda određivanja osjetljivosti gram-negativnih i gram-pozitivnih aerobnih bakterija prema antimikrobnim lijekovima. Sastoji se od trakica koje sadrže standardiziranu količinu nekog antibiotika koja se koristi za određivanje minimalne inhibicijske koncentracije (MIK) svakog pojedinog antibiotika izražene u µg/ml. Vrijednosti minimalnih inhibicijskih koncentracija koriste se u farmakokinetici i farmakodinamici te osiguravaju granicu sigurnosti i racionalni pristup u liječenju životinja (i ljudi) određenim lijekom. Dosadašnje metode za određivanje antimikrobne osjetljivosti temelje se na kvantitativnim dilucijskim tehnikama ili kvalitativnom disk difuzijskom postupku. Dilucijske metode temelje se na dvostrukim serijskim razrjeđenjima primijenjenog antibiotika u agaru ili bujonu. Disk difuzijska metoda (Kirby-Bauer) je metoda za određivanje osjetljivosti na antimikrobne lijekove brzorastućih bakterija u kojoj se koriste papirnati kolutići iz ko-

jih procesom difuzije standardizirana količina antibiotika difundira u agar na kojeg je nacijepljen pretraživani mikroorganizam.

E test se sastoji od tanke, neporozne plastične trakice 5 mm široke i 60 mm dugačke. Prednja strana trakice sadrži skalu s vrijednostima koncentracije antibiotika izraženim u µg/ml. Na poledinu trakice nanešen je antibiotik u različitim koncentracijama od najviše do najniže. U trenutku kada se trakica postavi na površinu agara, dolazi do izravne i efikasne difuzije antibiotika u agar. Nakon inkubacije, uočava se simetrična eliptična zona rasta pretraživane bakterijske kulture, a vrijednost minimalne inhibicijske koncentracije (MIK) očita se sa skale na mjestu gdje elipsasta zona inhibicije presjeca trakicu. E test, kao alternativa Kirby-Bauerovoj i agar dilucijskoj metodi, kojim se ujedno određuju i minimalne inhibicijske koncentracije nekog antibiotika, sve se češće koristi u istraživanjima osjetljivosti različitih, poglavito rezistentnih sojeva bakterija. Marley i sur. (1995.) istražili su vrijednost E testa uspoređujući ga s agar dilucijskim postupkom na 100 sojeva *P. aeruginosa* izdvojenih iz pacijenata oboljelih od cistične fibroze. Autori su istražili antipseudomonasni učinak ceftazidima, ciprofloksacina, piperacilina i tobramicina. Zaključili su da je uporaba E testa pouzdanija od agar dilucijske metode. Di Bonaventura i sur. (1997.) uspoređivali su minimalne inhibicijske koncentracije dobivene E testom s rezultatima osjetljivosti dobivenim metodom dilucije i disk-difuzijskom metodom 248 izolata vrste *P. aeruginosa* na amikacin,

aztreonam, ceftazidim, ciprofloksacin, gentamicin, imipenem, piperacilin, tikarcilin i tobramicin. Zaključili su da je E test pouzdanija metoda određivanja minimalne inhibicijske koncentracije od dilucijske i disk-difuzijske metode. Swiatlo i sur. (2000.) su istražili aktivnost četiri fluorokinolonska pripravka (ciprofloksacin, levofloksacin, ofloksacin i trovafloksacin) na 100 sojeva bakterijske vrste *P. aeruginosa* izdvojenih iz ljudi pomoću E testa, a ciprofloksacin je bio najdjelotvorniji fluorokinolon. Gençer i sur. (2002.) su istražili osjetljivost 99 kliničkih izolata bakterijske vrste *P. aeruginosa* izoliranih iz hospitaliziranih pacijenata na devet antipseudomonasnih lijekova (ciprofloksacin, amikacin, ceftazidim, meropenem, imipenem, kombinaciju piperacilina i tazobaktama, kombinaciju cefoperazona i sulbaktama, cefepim i tobramicin) E testom. Dokazali su da je 36% izolata bilo otporno na više skupina antibiotika. Najveću su osjetljivost pokazali na ciprofloksacin (75%) i amikacin (73%). Većina je izolata otpornih na karbapenem bila osjetljiva na ciprofloksacin i amikacin. Kucukates (2005.) je istraživala otpornost gram-negativnih bakterija (*Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* i *Klebsiella pneumoniae*) izoliranih na odjelu intenzivne skrbi Instituta za kardiologiju u Istanbulu. Izolirano je 367 mikroorganizama iz 171 pacijenta. Većina mikroorganizama izdvojena je iz dišnog sustava (45.5%) i krvi (36.7%). Osjetljivost je istražena E testom i to na amikacin, gentamicin, imipenem, kombinaciju amoksicilina i klavulanske kiseline, cefotaksim, ceftazidim, ceftriakson, ce-

fodizim, cefepim, kombinaciju piperacilina i tazobaktama, ciprofloksacin, levofloksacin, i kombinaciju ceftazidima i klavulanske kiseline. Najučinkovitiji antimikrobni lijekovi bili su imipenem (79.2% osjetljivih sojeva), levofloksacin (77% osjetljivih sojeva) i ciprofloksacin (71% osjetljivih sojeva). McKay i sur. (2007.) istražili su osjetljivost E testom 100 sojeva *P. aeruginosa* izdvojenih iz pasa s upalom vanjskog zvukovoda na enrofloksacin, marbofloksacin i orbifloksacin, pri čemu je marbofloksacin bio najdjelotvorniji. Rubin i sur. (2008.) su istraživali antimikrobnu otpornost vrste *P. aeruginosa* izdvojenih iz pasa s otitisom i piodermijom. Istražena je osjetljivost 106 sojeva prikupljenih diljem SAD-a na 32 antipseudomonasna antibiotika (kombinacija amoksisilina i klavulanske kiseline, ampicilin, cefazolin, cefepim, cefotaksim, cefotaksim s klavulanskom kiselinom, cefoksitin, cefpodoksim, ceftazidim, kombinacija ceftazidima i klavulanske kiseline, cefiofur, ceftriakson, ceflotin, imipenem, meropenem, kombinacija piperacilina i tazobaktama, ciprofloksacin, difloksacin, enrofloksacin, gatifloksacin, levofloksacin, marbofloksacin, nalidiksična kiselina, orbifloksacin, amikacin, gentamicin, kanamicin, streptomycin, sulfasoksazol, kombinacija trimetoprima i sulfametoksazola, tetraciklin i klo-ramfenikol). Istraživanjem je dokazano da antibiotici prve generacije cefalosporina, aminobenzilpenicilini i potencirani amoksisilin nisu imali nikakvo djelovanje na bakteriju *P. aeruginosa*. Isto tako autori ističu i da je otpornost na antipseudomonasne antibiotike niža u sojeva izdvojenih iz životinja nego li

u humanih sojeva *P. aeruginosa*. Iz navedenih istraživanja vidljivo je da je E test praktičnija, pouzdanija i za rutinsku laboratorijsku dijagnostiku jednostavnija metoda određivanja minimalne inhibicijske koncentracije od dilucijske i disk difuzijske metode. Nadalje, usporedbom rezultata istraživanja osjetljivosti humanih i animalnih sojeva bakterije *P. aeruginosa* na antibiotike uočena je niža razina rezistencije u sojeva animalnog podrijetla te stoga za sada ova bakterija predstavlja veću opasnost za zdravlje ljudi i to poglavito zbog svoje sve izraženije i proširenije rezistencije na antibiotike. Rezultati navedenih istraživanja upućuju na zaključak da su najučinkovitiji antimikrobni lijekovi imipenem i marbofloksacin no unatoč tome prije svakog liječenja potrebno je odrediti osjetljivost prema antipseudomonasnim antibioticima jednim od standardiziranih postupaka u čemu E test zauzima značajno mjesto zbog točnosti, jednostavnosti i lakoće izvođenja.

Sažetak

U radu su prikazani rezultati istraživanja *in vitro* osjetljivosti bakterije *Pseudomonas aeruginosa* na antipseudomonasne lijekove pomoću E testa, disk difuzijskog testa i dilucijskom metodom. Najučinkovitiji antimikrobni lijekovi prema rezultatima većine objavljenih istraživanja bili su imipenem te fluorokinolonski antibiotici marbofloksacin i ciprofloksacin. Rezultati najnovijih istraživanja su pokazali da se rezistencija bakterije *P. aeruginosa* na antimikrobne lijekove drastično

povećava pa tako ti isti antibiotici uskoro neće biti učinkoviti u liječenju pseudomonasnih infekcija. Usporedbom rezultata određivanja osjetljivosti različitim postupcima pokazalo se da je E test precizna i točna metoda za određivanje minimalne inhibicijske koncentracije, a zbog jednostavnijeg izvođenja i praktičnija od ostalih.

Literatura

1. AIRES, J. R., T. KÖHLER, H. NIKAIIDO and P. PLESIANT (1999): Involment of an active efflux system in the natural resistance of *Pseudomonas aeruginosa* to aminoglycosides. *Antimicrob. Agents Chemother.* 11, 2624-2628.
2. BLUE, J. L. and R. E. WOOLEY (1977): Antibacterial sensitivity patterns of bacteria isolated from dogs with *otitis externa*. *JAVMA* 15, 362-363.
3. COLOMBINI, S., R. S. MERCHANT and G. HOSGOOD (2000): Microbial flora and antimicrobial susceptibility patterns from dogs with *otitis media*. *Vet. Dermatol.* 11, 235-239.
4. DI BONAVENTURA, G., E. RICCI, N. DELLA LOGGIA, G. CATAMO and R. PICCOLOMINI (1998): Evaluation of the E Test for antimicrobial susceptibility testing of *Pseudomonas aeruginosa* isolates from patients with long-term bladder catheterization. *J. Clin. Microbiol.* 36, 824-826.
5. GENÇER, S., Ö. AK, N. BENZONANA, A. BATIREL and S. ÖZER (2002): Susceptibility patterns and cross resistances of antibiotics against *Pseudomonas aeruginosa* in a teaching hospital of Turkey. *Ann. Clin. Microbiol. Antimicrob.* 1: 2.
6. GREENE, C. G. (1998): Infectious diseases of the dog and cat. 2 Edn. W. B. Saunders, 217-221.
7. HSU, D. I., M. P. OKAMOTO, R. MURTHY and A. WONG-BERINGER (2005): Fluoroquinolone-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: risk factors for acquisition and impact on outcomes. *J. Antimicrob. Chemother.* 55, 535-541.
8. IHRKE, P. J., M. G. PAPICH and T. C. DEMANUELLE (1999): The use of fluoroquinolones in veterinary dermatology. *Vet. Dermatol.* 10, 193-204.
9. KENNETH, T. (2008): University of Wisconsin-Madison Department of Bacteriology, (<http://bioinfo.bact.wisc.edu/themicrobialworld/Pseudomonas.html>)
10. KISS, G., S. RADVANYI and G. SZIGETI (1997): New combination for the therapy of canine *otitis externa*. I. Microbiology of *otitis externa*. *J. Small Anim. Pract.* 2, 51-56.
11. KUCUKATES, E. (2005): Antimicrobial resistance among Gram-negative bacteria isolated from intensive care units in a cardiology institute in Istanbul, Turkey. *Jpn. J. Infect. Dis.* 58, 228-231.
12. MARLEY, E. F., C. MOHLA and J. M. CAMPOS (1995): Evaluation of E-Test for determination of antimicrobial MICs for *Pseudomonas aeruginosa* isolates from cystic fibrosis patients. *J. Clin. Microbiol.* 33, 3191-3193.
13. MCKAY, L., C. D. B. S. SCHUMAN ROSE, J. L. MATOUSEK, L. S. SCHMEITZEL, N. M. GIBSON and J. M. GASKIN (2007): Antimicrobial testing of selected fluoroquinolones against *Pseudomonas aeruginosa* isolated from canine otitis. *J. Am. Anim. Hosp. Ass.* 43, 307-312.
14. MUELLER, E., and A. HEUSINGER (1994): Microbiological results of ear swabs from dogs and cats. *Tierärztl. Prax.* 1, 80-84.
15. NAGLIĆ, T., D. HAJSIG, J. MADIĆ and LJ. PINTER (2005): Veterinarska mikrobiologija, specijalna bakteriologija i mikologija. Zagreb: Veterinarski fakultet i Hrvatsko mikrobiološko društvo.
16. QUINN, P. J. CARTER, M. E., B. K. MARKEY, and G. R. CARTER (1994): *Clinical Veterinary Microbiology.*

- Wolfe Publishing, London.
17. RORICH, P. J., G. V. LING, A. L. RUBY, S. S. JANG, and D. L. JOHNSON (1983): *In vitro* susceptibilities of canine urinary bacteria to selected antimicrobial agents. JAVMA 8, 863-867.
 18. RUBIN, J., R. D. WALKER, K. BLICK-ENSTAFF, S. BODEIS-JONES and S. ZHAO (2008): Antimicrobial resistance and genetic characterization of fluoroquinolone resistance of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from canine infections. Vet. Microbiol. 131, 164-172.
 19. SWIATLO, E., E. MOORE, J. WATT and L. S. MCDANIEL (2000): *In vitro* activity of four fluoroquinolones against clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* determined by the E test. Int. J. Antimicrob. Agent. 15, 73-76.
 20. TAMBIĆ-ANDRAŠEVIĆ, A. (2007): Antibiotic resistance the leading medical problem at the beginning of the 21st century. Medicina 43, 7-14.
 21. WALKER, R. C. (1999): The fluoroquinolones. Mayo. Clin. Proc. 74, 1030-1137.

***In vitro* activity of antipseudomonal agents against *Pseudomonas aeruginosa* determined by the E test**

Ana MARETIĆ, DVM; Branka ŠEOL, DVM, Ph.D., Associate Professor, Faculty of Veterinary Medicine, Zagreb

In this study, results conducted by different researchers, are proven results showing *in vitro* sensitivity of *Pseudomonas aeruginosa* against antipseudomonal agents. According to previously published result the most effective antimicrobial agents against *Pseudomonas aeruginosa* were imipenem and the fluoroquinolone antibiotics marbofloxacin and ciprofloxacin. Although, after ongoing research within the study, a resistance among *P. aeruginosa* has

risen dramatically and those antimicrobial agents may no longer be acceptable for antipseudomonal therapy. The methods for determining antimicrobial susceptibility were E test, agar dilution test and disk diffusion test. Comparison of the results after converting the MIC data to the following qualitative categories, susceptible, intermediate and resistant, showed that the E test is a reliable method for the determination of MICs.

DNEVNE VIESTI

PRVI DOKTOR ŽIVINARSTVA U UGARSKOJ. Na visokoj živinarskoj školi u Budimpešti obaviti će se danas prije podne prva promocija na čast doktore živinarstva.

“Obzor” (Zagreb), 39, 3, 1907 (god. 48) (9. veljače 1907.).



RABIKAL®

cjepivo

Najčešće korištena zaštita
protiv bjesnoće

PRAZINON® plus

tablete za pse

Pouzdana zaštita od ehinokokoze
i ostalih želučano crijevnih
parazitoza pasa



VETERINA d.o.o.
Svetonedeljska 2 • Kalinovica
10436 Rakov Potok • Croatia
www.veterina.hr

Plućna hipertenzija u pasa i mačaka



M. Torti, Vesna Matijatko, Ivana Kiš, V. Mrljak i Ljiljana Pinter

Uvod

Plućni krvotok ima značajke niskotlačnog sustava s velikim protokom krvi (Van Israël, 2003.a). Vrijednosti plućnog arterijskog tlaka u zdravih pasa kreću se, za sistolički tlak oko 25 mmHg, za dijastolički 8 mmHg i srednji tlak 12 do 15 mmHg. Nizak plućni arterijski tlak minimalizira opterećenje desne klijetke i osigurava optimalnu opskrbu miokarda desnog srca arterijskom krvlju. Porast protoka krvi kroz plućni arterijski sustav prati minimalan porast plućnog arterijskog tlaka pa do razvoja plućne arterijske hipertenzije dolazi tek kada je oštećeno do 60% mikrocirkulacijskog korita (Perry i sur., 1991., Johnson i Hamlin, 1995.).

Plućna hipertenzija (PH) označava porast sistoličnog plućnog arterijskog tlaka iznad 35 mmHg, odnosno sred-

njeg plućnog arterijskog tlaka iznad 25 mmHg. Dijeli se na primarnu (idiopatsku, nepoznatog uzroka), koja je u pasa i mačaka rijetka, i sekundarnu (najčešće je posljedica bolesti pluća ili lijevog srca) (Johnson i sur., 1999.a., Barst i sur., 2004.). Uzroci sekundarne PH navedeni su u tablici 1.

Patogeneza

Neovisno o uzroku, PH je posljedica porasta plućnog vaskularnog otpora koji je u većini slučajeva posljedica hipoksijom izazvane vazokonstrikcije plućnih arterija. U teškim oblicima PH, osim vazokonstrikcije, u patogenezi značajnu ulogu imaju i angioproliferacijske promjene koje dovode do tra-

Marin TORTI, dr. vet. med., znanstveni novak, dr. sc. Vesna MATIJATKO, dr. vet. med., docentica, dr. sc. Ivana KIŠ, dr. vet. med., viša asistentica, dr. sc. Vladimir MRLJAK, dr. vet. med., redoviti profesor, dr. sc. Ljiljana PINTER, dr. vet. med., redovita profesorica, Veterinarski fakultet Zagreb

Tablica 1. Uzroci plućne arterijske hipertenzije

1. Alveolarna hipoksija s vazokonstrikcijom i remodeliranjem plućnog krvožilja
intersticijska plućna bolest/fibroziranje intersticija
kronična opstruktivna plućna bolest
pneumonija
traheobronhalne bolesti
plućna mineralizacija
2. Plućna vaskularna opstruktivna bolest
dirofilarioza
plućna tromboembolija
plućni endarteritis
3. Volumno preopterećenje plućnog optoka krvi
velike prirođene srčane greške sa skretanjem krvi (pr. atrijski i ventrikulski septalni defekti, perzistirajući duktus arteriozus)
4. Povišenje tlaka u venskom dijelu plućnog optoka krvi
mitralna regurgitacija
mitralna stenoza
dilatativna kardiomiopatija
lijevostrano zatajivanje srca
5. Idiopatska plućna hipertenzija

jnog smanjenja lumena i rastegljivosti žile (Nauser i Stites, 2003., Ware, 2007.). Brojni autori smatraju da do hipoksijom izazvane vazokonstrikcije dolazi kod kronične opstruktivne plućne bolesti, torzije plućnog krila, kolapsa ili opstrukcije dišnih puteva, hipoventilacije itd. (Ware, 2007.).

Četiri su osnovna patogenetska mehanizma kojima hipoksija dovodi do vazokonstrikcije: učinkom na kalijeve i kalcijeve kanale te na alfa1-adrenergične receptore, promjenom odnosa između vazokonstrikcijskih i vazodilatacijskih prostaglandina i pojačavanjem sinteze endotelina (Samaržija i Šušković, 2003.).

U patogenezi promjena na krvnim žilama bitnu ulogu ima poremećaj funkcije endotela, točnije hipertrofija

glatkog mišićja, proliferacija i fibroziranje intime te pojačano odlaganje izvanstaničnog matriksa (pr. elastina, kolagena i fibronektina) (Gust i Schuster, 2001., Van Israëel, 2003.a.). Navedene su promjene najvjerojatnije uzrokovane kroničnom vazokonstrikcijom povezanom s perzistirajućom upalom i pojačanom ekspresijom čimbenika rasta te pojačanim otpuštanjem vazooaktivnih medijatora (Voelkel i Tudor, 1995., Johnson i sur., 1999.a). U normalnim uvjetima endotelne stanice moduliraju aktivnost glatkog mišićja putem izlučivanja vazodilatacijskih/antimitotičkih (pr. prostaciklina i dušikovog monoksida) i vazokonstrikcijskih/mitogenih tvari (pr. endotelina i tromboksana A2), dok kod PH

dominira izlučivanje vazokonstriktora (posebice endotelina), čega je posljedica remodeliranje krvnih žila, hipertrofija glatkog mišićja, pojačano stvaranje i odlaganje kolagena i agregacija trombocita (Ware, 2007.). Od ostalih ćemo medijatora spomenuti i serotonin, koji je također snažan vazokonstriktor koji dovodi do hipertrofije glatkog mišićja i agregacije trombocita (Nauser i Stites, 2003.). U patogenezi PH još sudjeluju i angiotenzin 2 te acetilkolin (Van Israël, 2003.a).

Patoanatomske promjene najizraženije su na malim plućnim arterijama i arteriolama, a dijelimo ih prema Heath-Edwardsovoj klasifikaciji u šest stadija (Samaržija i Šušković, 2003., Van Israël, 2003.a):

- hipertrofija medije,
- proliferacija stanica intime praćena hipertrofijom mišićnih stanica,
- progresija hipertrofije medije i proliferacije stanica intime, uz umnažanje mišićnih stanica i pojavu koncentričnih fibroznih promjena čega je posljedica obliteracija brojnih malih plućnih arterija i arteriola,
- dilatacija i aneurizmatско širenje endotela i mišićja malih plućnih arterija i arteriola te posljedična pojava tzv. pleksiformnih lezija,
- progresija tzv. pleksiformnih lezija s hijalinizacijom i fibroziranjem intime, i
- fibrinoidna nekroza i nekrotizirajući arteritis.

Plućna vaskularna opstruktivna bolest, odnosno obliteracijska plućna arterijska hipertenzija najčešće je po-

sljedica plućne tromboembolije, *in situ* plućne tromboze ili dirofilarioze (Ware, 2007.). Poremećaj u plućnoj cirkulaciji zajedno s poremećajem funkcije endotela pogoduju agregaciji trombocita, aktivaciji hemostatičkih mehanizama i izlučivanja snažnih vazokonstriktora, poput tromboksana A₂, endotelina i serotonina. Stvaranje dušikovog monoksida je smanjeno pa je sposobnost vazodilatacije zanemariva (Sander i sur., 2003.). PH često prati prirođene srčane greške, a posljedica je volumnog preopterećenja plućnog optoka krvi koje dovodi do remodeliranja plućnog krvožilja (Turk i sur., 1982.). Patoanatomske promjene opisane kod PH koja prati Eisenmengerov sindrom su: hipertrofija medije, proliferacija i fibroziranje intime, okluzija malih plućnih arteriola i pleksiformne lezije (McLaughlin, 2004.).

Glavna je i ujedno najteža posljedica PH pojava tzv. plućnog srca, tj. hipertrofije i dilatacije desnog srca. Desno srce zatajuje jer se iscrpi svladavajući visoki tlak u plućnom optoku krvi protiv kojeg istiskuje krv. Prema tome, što je PH težeg stupnja i što dulje traje to se prije pojavljuju znakovi zatajivanja desnog srca (Bakran, 2005.).

Klinička slika

Simptomi PH su obično blagi, neprimjetni i nespecifični, što otežava prepoznavanje same bolesti. Na PH sumnjamo kada postoji perzistirajuća dispneja, zamor ili nepodnošenje napora. Životinje s blagom do srednje teškom PH često su asimptomatske

(Ware, 2007.). U istraživanju Johnson i sur. (1999.a) od simptoma su primijećeni: nepodnošenje napora (u 45% slučajeva), kašalj (30%), dispneja (28%) i sinkopa (23%). Ukoliko je PH posljedica plućne tromboembolije često nalazimo akutnu dispneju, tahikardiju, letargiju, ponekad povraćanje i kašalj (Johnson i sur., 1999.b).

Kod pasa s PH auskultacijski u većini slučajeva možemo čuti sistolički šum, najčešće nad mitralnim ili trikuspidalnim zaliscima, a rjeđe nad aortalnim ili pulmonalnim zaliscima. Teške oblike PH prati glasan ili pocijepan drugi srčani ton. Ukoliko je došlo do razvoja zatajivanja desnog srca uz prije navedene simptome nalazimo ascites, distenziju jugularnih vena i supkutane edeme (Johnson i sur., 1999.a).

Postavljanje dijagnoze

Već na temelju anamnestičkih podataka (zamaranja i nepodnošenja napora) te nalaza kliničkog pregleda životinje možemo, između ostalog, posumnjati i na PH. Naravno, konačnu dijagnozu postavljamo temeljem nalaza ehokardiografske pretrage.

Rentgenografski PH najčešće prate proširenje plućne arterije i njezinih velikih grana te ponekad i povećanje desnog ventrikula (Perry i sur., 1991.). Nadalje, kod težih oblika PH rentgenografski redovito nalazimo kardiomegaliju (osobito desne strane srca), proširenje plućne arterije i infiltraciju plućnog parenhima. Ukoliko PH prati i zastojno zatajivanje desne strane srca navedenim se promjenama često pridružuju znakovi pleuralnog izlje-

va, proširenja kaudalne šuplje vene i povećanja jetre (Ware, 2007.).

U elektrokardiogramu možemo uočiti promjene koje prate povećanje desnog atrija ili desnog ventrikula, a opisane su i pojava fibrilacije atrija, supraventrikulskih ili ventrikulskih tahiaritmija te rjeđe bradikardija i atrioventrikulskog bloka (Johnson i sur., 1999.a).

Ehokardiografski, dvodimenzionalnim i M-prikazom, možemo naći: povećanje desnog atrija i ventrikula, hipertrofiju desnog ventrikula, proširenje plućne arterije, poremećaj motiliteta interventrikulskog septuma, dijastoličku disfunkciju lijevog ventrikula i smanjenu veličinu lijevog ventrikula sa smanjenim volumenima na kraju sistole i dijastole (Johnson i sur., 1999.a). Smanjena veličina lijevog ventrikula (pseudohipertrofija) sa smanjenjem volumena na kraju sistole i dijastole je loš prognostički pokazatelj (Van Israël, 2003.b, Ware, 2007.).

Dopler ehokardiografskom pretragom se potvrđuju trikuspidalna regurgitacija, plućna regurgitacija te se, neinvazivno, procjenjuje visina tlakova u desnom ventrikulu i plućnoj arteriji (Ware, 2007.). Određivanje maksimalne vršne brzine regurgitacijskog toka krvi na razini trikuspidalnih zalistaka omogućava procjenu sistoličkog tlačnog gradijenta između desnog atrija i ventrikula pomoću modificirane Bernoullijeve jednadžbe. Izračunom navedenog tlačnog gradijenta, uzimajući u obzir vrijednost središnjeg venskog tlaka (ili jednostavno pridodavajući izračunatoj vrijednosti 8 do 10 mmHg), dobivamo približnu vrijednost sistoličkog tlaka u desnom ventrikulu pa tako i plućnoj

arteriji. Vrijednost dijastoličkog tlaka u plućnoj arteriji dobivamo pomoću maksimalne vršne brzine regurgitacijskog toka na razini zalistaka plućne arterije, odnosno određivanjem dijastoličkog tlačnog gradijenta između plućne arterije i desnog ventrikula. PH prati vršna brzina regurgitacijskog toka krvi na razini trikuspidalnih zalistaka veća od 2,8 m/sec, odnosno na razini zalistaka plućne arterije veća od 2,2 m/sec. O blagom obliku PH govorimo ukoliko je vršna brzina na razini trikuspidalnih zalistaka 2,9 do 3,5 m/sec (tlačni gradijent ~35 do 50 mmHg), o umjerenom s vršnom brzinom od 3,6 do 4,3 m/sec (~51 do 75 mmHg) i teškom, s vršnom brzinom većom od 4,3 m/sec (tlačni gradijent >75 mmHg) (Glaus i sur., 2003., Barst i sur., 2004.).

Tlak u plućnoj arteriji najtočnije možemo odrediti kateterizacijom desnog srca i plućnog krvožilja pomoću Swan-Ganzovog katetera. Na taj način izravno možemo odrediti tlakove u desnom atriju, desnom ventrikulu i plućnoj arteriji te plućnog zapriječenog kapilarnog tlaka (engl. *pulmonary capillary wedge pressure*, PCWP). Pomoću PCWP-a možemo razlikovati PH uzrokovanu prije svega zatajivanjem lijevog srca (PCWP viši od dijastoličkog tlaka plućne arterije) od PH uzrokovane prije svega bolešću pluća ili plućnog krvožilja (PCWP niži od dijastoličkog tlaka plućne arterije) (Voelkel i Cool, 2004.).

Liječenje

Uz etiološko liječenje, ukoliko je uzrok poznat, PH liječimo pomoću vazodilatatora, primjene kisika, bronhodila-

tatora i inhibitora fosfodiesteraze.

Kisik je vrlo snažan vazodilatator, smanjuje plućni vaskularni otpor i znatno poboljšava hipoksemiju. Najčešće se primjenjuje u hitnih pacijenata, putem nosne sonde ili kaveza s kisikom.

Ksantinski bronhodilatatori, teofilin i aminofilin dovode do trajnije vazodilatacije plućnog krvožilja i poboljšanja funkcije desnog ventrikula. Nadalje, teofilin poboljšava kontraktilnost dijafragme i umanjuje zamor dišnog mišićja (Johnson i Hamlin, 1995., Van Israë, 2003.b). Najbolje je koristiti pripravke teofilina s produljenim otpuštanjem u dozi od 20 mg/kg tjelesne težine svakih 12 sati peroralno (Ware, 2007.). U hitnim slučajevima primjenjuje se aminofilin u dozi od 2 do 5 mg/kg polagano intravenski svakih 12 sati ili 10 do 11 mg/kg intramuskularno svakih 6 do 8 sati. Selektivni agonisti β_2 -adrenergičnih receptora (poput, terbutalina i salbutamola) isto tako poboljšavaju plućnu hemodinamiku, no njihov učinak u pasa i mačaka nije u potpunosti istražen.

U liječenju PH koriste se i inhibitori konvertaze angiotenzina (ACE inhibitori). Od ACE inhibitora se najčešće koriste enalapril (0,5 mg/kg tjelesne težine svaka 24 sata [do svakih 12 sati] peroralno) i benazepril (0,25 do 0,5 mg/kg tjelesne težina svaka 24 sata (do svakih 12 sati) peroralno), a od diuretika furosemid (1 do 3 mg/kg svaka 24 sata [do svakih 8 sati] peroralno). ACE inhibitori ne dovode do znatnije vazodilatacije, ali umanjuju remodeliranje plućnog krvožilja (Van Israë, 2003.b, Ware, 2007.).

Sildenafil je visoko selektivan inhibitor fosfodiesteraze tipa 5 koji dovodi do vazodilatacije plućnih arterija povećavajući koncentraciju cikličnog guanozin monofosfata (cGMP) u plućnom krvožilju. Povećanjem koncentracije cGMP posljedično se povećava aktivnost endogenog dušičnog monoksida, što dovodi do širenja krvnih žila. Najčešće se primjenjuje u dozi od 0,5 do 2 mg/kg tjelesne težine (prema nekim autorima i do 3 mg/kg) svakih 8 do 12 sati (Ware, 2007., Kellihan, 2008.). Sildenafil dovodi do blagog sniženja tlaka u plućnoj arteriji, ali do znatnijeg kliničkog poboljšanja.

Prognoza

Prognoza je loša ukoliko se radi o teškom obliku PH. U istraživanju Kellihan (2008.) vrijeme preživljavanja se kretalo od 8 do 734 dana. Nakon postavljanja dijagnoze i započinjanja liječenja sildenafilom, ukoliko su psi preživjeli prvi tjedan liječenja postojala je 95% vjerojatnost da će preživjeti tri mjeseca nakon započinjanja liječenja, odnosno 84% vjerojatnost preživljavanja od šest mjeseci i 73% vjerojatnost preživljavanja od godine dana.

Sažetak

Plućnu hipertenziju definiramo kao povišenje sistoličnog plućnog arterijskog tlaka iznad 35 mmHg, odnosno srednjeg plućnog arterijskog tlaka iznad 25 mmHg. Etiološki se dijeli na primarnu, koja je rijetka, i sekundarnu, koja je najčešće posljedica bolesti pluća ili lijevog srca. Neovisno o uzroku, PH je posljedica porasta plućnog vaskularnog otpora koji je u većini slučajeva

posljedica hipoksijom izazvane vazokonstrikcije plućnih arterija. Simptomi PH su obično blagi, neprimjetni i nespecifični, a na bolest sumnjamo kada postoje perzistirajuća dispneja, kašalj, zamor ili nepodnošenje napora. Definitivnu dijagnozu bolesti postavljamo dopler ehokardiografskom pretragom, određivanjem vršne brzine i tlačnog gradijenta. Pomoću navedenih pokazatelja određujemo i stupanj PH. Liječenje se PH provodi vazodilatatorima (kisik, ACE inhibitori, sildenafil) i bronhodilatatorima.

Literatura

1. BAKRAN, I. (2005): Poremećaji prometa tekućine i krvotoka u plućima. U: Patofiziologija (GAMULIN, S., M. MARUŠIĆ i Z. KOVAČ, ur.), 6. obnovljeno i izmijenjeno izdanje, Medicinska naklada, Zagreb, 915-917.
2. BARST, R. J., M. MCCOON, A. TORBICKI, O. SITBON, M. J. KROWKA, H. OLSCHESKI and S. GAINE (2004): Diagnosis and differential assessment of pulmonary arterial hypertension. *J. Am. Coll. Cardiol.* 43, 40S-47S.
3. GLAUS, T. M., M. HÄSSIG, C. BAUMGARTNER and C. E. REUSCH (2003): Pulmonary hypertension induced in dogs by hypoxia at different high-altitude levels. *Vet. Res. Commun.* 27, 661-670.
4. GUST, R. and D. P. SCHUSTER (2001): Vascular remodeling in experimentally induced subacute pulmonary hypertension. *Exp. Lung Res.* 27, 1-12.
5. JOHNSON, L. R. and R. L. HAMLIN (1995): Recognition and treatment of pulmonary hypertension. In: *Kirk's Current Veterinary Therapy XII* (BONAGURA, J., ed.). W. B. Saunders Comp., Philadelphia, 887-892.
6. JOHNSON, L., J. BOON and E. C. ORTON (1999a): Clinical characteristics of 53 dogs with Doppler-derived evidence of pulmonary hypertension: 1992-1996.

- J. Vet. Intern. Med. 13, 440-447.
7. JOHNSON, L. R., M. R. LAPPIN and D. C. BAKER (1999b): Pulmonary thromboembolism in 29 dogs: 1985-1995. J. Vet. Intern. Med. 13, 338-345.
8. KELLIHAN, H. B. (2008): Pulmonary Hypertension: Are You Missing the Diagnosis?. American College of Veterinary Internal Medicine Forum 2008 Proceedings Online (www.vin.com).
9. MCLAUGHLIN, V. V. (2004): Classification and epidemiology of pulmonary hypertension. Cardiol. Clin. 22, 327-341.
10. NAUSER, T. D. and S. W. STITES (2003): Pulmonary hypertension: new perspectives. Congest. Heart Fail. 9, 155-162.
11. PERRY, L. A., A. R. DILLON and T. L. BOWERS (1991): Pulmonary hypertension. Compend. Cont. Educ. Pract. Vet. 13, 226-233.
12. SAMARŽIJA, M. i T. ŠUŠKOVIĆ (2003): Plućna hipertenzija. U: Interna medicina (VRHOVAC, B., I. FRANCETIĆ, B. JAKŠIĆ, B. LABAR i B. VUCELIĆ, ur.), 3. promijenjeno i dopunjeno izdanje, Naklada Ljevak, Zagreb, 613-615.
13. SANDER, M., K. L. WELLING, J. B. RAVN, B. BOBERG and O. AMTORP (2003): Endogenous NO does not regulate baseline pulmonary pressure, but reduces acute pulmonary hypertension in dogs. Acta Physiol. Scand. 178, 269-277.
14. TURK, J. R., J. B. MILLER and R. D. SANDE (1982): Plexogenic pulmonary arteriopathy in a dog with ventricular septal defect and pulmonary hypertension. J. Am. Anim. Hosp. Assoc. 18, 608-612.
15. VAN ISRAËL, N. (2003a): The pathophysiology of pulmonary hypertension in the dog and the cat. UK Vet. 8, 1-5.
16. VAN ISRAËL, N. (2003b): Diagnosis and treatment of pulmonary hypertension in the dog and the cat. UK Vet. 8, 1-5.
17. VOELKEL, N. F. and R. M. R. TUDER (1995): Cellular and molecular mechanism in the pathogenesis of pulmonary hypertension. Eur. Respir. J. 8, 2129-2138.
18. VOELKEL, N. F. and C. COOL (2004): Pathology of pulmonary hypertension. Cardiol. Clin. 22, 343-351.
19. WARE, W. (2007): Cardiovascular Disease in Small Animal Medicine, Manson Publishing/The Veterinary Press, London, 340-350.

Pulmonary hypertension in dogs and cats

Marin TORTI, DVM, Junior Researcher, Vesna MATIJATKO, DVM, Ph.D., Assistant Professor, Ivana KIŠ, DVM, Ph.D., Assistant Professor, Vladimir MRLJAK, DVM, Ph.D., Full Professor, Ljiljana PINTER, DVM, Ph.D., Full Professor, Faculty of Veterinary Medicine, Zagreb

Pulmonary hypertension (PH) is defined as an increase in pulmonary systolic pressure above 35 mmHg, or mean pulmonary systolic pressure above 25 mmHg. There are two types of PH: primary (essential or idiopathic) and secondary. Regardless of the cause, PH is the consequence of increased pulmonary vascular resistance caused by vasoconstriction of pulmonary arteries

due to hypoxia. Symptoms of PH are often mild. The most common symptoms of PH are dyspnoea, exercise intolerance and cough. Definitive diagnosis is established by Doppler echocardiography. Vasodilators and bronchodilators are the main drug group used in treatment of PH. Prognosis is regarded as poor.

Za uporabu u veterinarskoj medicini

giraxa®
prašak za peroralnu otopinu

antibakterijski lijek za crijevne infekcije

polimiksin, kolistin
za telad, prasadi i peradi

**KLASIČAN
I POUZDAN**

- Sadržava kolistin sulfat (u dobro topivom obliku).
- Koristi se za sprječavanje i liječenje želučano-crijevnih infekcija u teladi, prasadi i peradi.
- Kolistin je vrlo djelotvoran na gram-negativne bakterije, posebno na enterobakterije otporne na druge antibiotike.
- Kolistin posjeduje odličnu baktericidnu aktivnost na mnoge aerobne bacile koje uzrokuju teške infekcije i proljev u domaćih životinja, posebno na *E. coli* i *Salmonella* spp..
- Djelovanje kolistina je ograničeno na probavni trakt jer se gotovo ne resorbira iz želuca i crijeva, a u crijevnu sluznicu ne prodire. Ta osobina osigurava mu kratku karenciju.
- Otpornost bakterija na kolistin pojavljuje se izvanredno rijetko.
- Iz želučano-crijevnog trakta izlučuje se izmetom isključivo u vezanom obliku.
- Ne djeluje na korisnu floru probavnog trakta.

Detaljnije informacije možete dobiti od firme:

KRKA - FARMA d.o.o.
Radnička cesta 48/II
p.p. 205, Zagreb 10002
Telefon 01/63 12 100, 63 12 101
Faks 01/61 76 739
E-mail: krka-farma@zg.htnet.hr
www.krka-farma.hr



*Naša inovativnost i znanje
za djelotvorne i neškodljive
proizvode vrhunske kakvoće.*

Prethodnici naših najstarijih mjesečnika „Hrvatska pčela” (1881.) i „Viestnik prvoga obćega Hrvatskoga društva za gojenje lova i ribarstva” (1892.)

Maks Karlović



Uvod

Potkraj 19. stoljeća počela su izlaziti u Hrvatskoj dva mjesečnika: „Hrvatska pčela” u Osijeku 1881. godine i „Viestnik prvoga obćega hrvatskoga društva za gojenje lova i ribarstva” 1892. godine. Po tome što su se oba ta mjesečnika održala do danas to su oni istodobno i najstariji – iz ta dva područja – na slavenskom jugu. Značajno je pri tome navesti da su i u jednom i u drugom mjesečniku povremeno surađivali, a u nekim razdobljima i učestalim zapisima i veterinarski stručnjaci. Isto je tako zanimljivo da su se prije jednog i drugog mjesečnika pojavili njihovi prethodnici i oba u Varaždinu, ali su oba (prvi nakon prvoga i drugi nakon neustanovljenoga broja) prestali izlaziti. Budući da je od prvoga sačuvan primjerak, od drugog samo kratke zabilješke u tadašnjim dnevnicima, a ni

jedan sačuvani primjerak, u ovom će se prikazu navesti sačuvani podatci:

„HRVATSKA PČELA”. Jedini sačuvani broj izašao je u Varaždinu prije 132 godine (1. veljače 1877.) kao prilog tadašnjem tjedniku „Pučki prijatelj”. „Pučki prijatelj” je izlazio svakog petka, a za „Hrvatsku pčelu” bilo je predviđeno da će izlaziti svakog drugog mjeseca. Na žalost, taj prvi primjerak izašao je samo jednom i to na osam stranica (20,5 cm x 14,5 str). Uredio ga je F. Stepanek i tiskao Platzer ml. Sadržaj mu je bio:

- PLOHL-HERDVIGOV, R. F. – Našoj pčeli (pjesma).
- UREDNIČTVO – Prijateljem pčelarstva, plemenitim podupirateljem svakoga podhvata u korist podizanju narodnoga gospodarstva.
- T-or – Upliv pčelarstva na duševno

Dr. sc. Maks KARLOVIĆ, umiroveljni znanstveni savjetnik, Zagreb

naobraženje čovjeka, i to na njegovu misao i razum, na njegovu volju i od ove oviseći čudoredan život. (Dalje sledi).

- M. B. – Prvi poslovi oko pčelaca u godini. (Dalje sledi).
- Prve tri godine moga pčelarenja. (Dalje sledi).
- Sitnice: Med nam služi kano liek. Pirike kano zimsko krma za pčele. Pčele se bude na veliko gojile. Med i vosak.

STEPANEK. F. – Molbe Hrvatske pčele.



Slika 1. Naslovnica prvog broja mjesečnika „Hrvatska pčela“

Budući da je ovo prvi pčelarski časopis, a zanimljiv je i razlog njegova pojavljivanja pa se u prilogu donosi uvodni zapis Uredništva čitateljima:

„S iskrenim pozdravom dolazimo u susret od mnogo rodoljuba izraženoj želji, da se o podizanju domaćega

pčelarstva raditi počme. Naša domovina ima, hvala Bogu, razmierno prema inim zemljama velik broj pčelara te se iz nje izvozi prilično meda. Pače u Primorju je pčelarstvo siromašnomu puku vrelo obiljnijega dohodka te se broji u znatniju granu obrtnosti. To svjedoče u pojedinim miestih napose sagrađene skupe preše, kano u Rieci, Novom i t.d. Nu radi se kod nas sve po staru. Naša će biti briga buditi ljubav prema ovoj živinici, te najjednostavnije radnje opisivati i narod poučavati.

Budu li nas rodoljubi u neutrudivom našem maru i radu oko napredka materialnog roda si, pomogli, budu li nam dovoljan broj čitatelja potražili, mi ćemo i slike naručiti, bez kojih teško da bi uspjeli mogli kako bi za želiti bilo.

Molimo dakle, da nam se gospoda prijatelji „Pčele hrvatske“ najave do 25. veljače te polože tu malu svoticu pčelarstvu hrvatskomu na procvat.

Još liepo molimo umne naše pčelare, da nam pomoć svoju ne uzkrate. Od nekih imamo pri ruci vrlo sastavke. Hvala im!

Uzdajući se podpori našem podhvatu bilježi se na svaku uslugu spremno Uredništvo“.

Četrnaest dana nakon objavljivanja „Hrvatske pčele“ u Varaždinu nalazimo u tjedniku „Bolletino della Dalmazia – Gospodarski list dalmatinski“ (Anon. 1877.) iz Zadra sljedeći zapis:

„Danom 1. veljače tek. u Varaždinu pod uredništvom gospodina Fr. Stepaneka, počeo je izlaziti novi list, Hrvatska pčela. Izlazi 1. svakoga drugog mjeseca. Ciena mu je na cielu godinu novčića 50; pretplatnici pako

„Pučkoga prijatelja“ dobivaju „Pčelu“ za nov. 30. Mi se nadamo, da će naši štovani župnici i pučki učitelji, ne samo nabaviti ovaj toli jevtini listić, nego ga jošte i podupriti njihovim vještim perom“.

Na žalost, ni usprkos toj potpori nastavka nije bilo. Bilo je, vjerojatno prerano razdoblje za takav početak. Ipak, samo četiri godine kasnije izašao je u Osijeku prvi broj novog mjesečnika pod istim naslovom „Hrvatska pčela“ koji se uspio održati do današnjih dana.

Dok, o „Hrvatskoj pčeli“ postoji sačuvan prvi i jedini broj, o prethodniku „Viestnika prvoga obćega hrvatskoga društva za gojenje lova i ribarstva“ nije pronađen ni jedan sačuvani primjerak, a ne zna se ni koliko je brojeva objavljeno, na koliko stranica i kakvog je bio izgleda. Zna se da je izlazio pod imenom „PRVI HRVATSKO-SLAVONSKO-DALMATINSKI LOVAČKI LIST“. O njegovom postojanju postoje zapisi u tadašnjim publikacijama.

Prema zapisu u prvom broju „Šumarskog lista“ za godinu 1892. (Anon. 1892.a) moglo bi se pretpostaviti, da je taj siječanjski broj bio objavljen prije spomenutog „Lovačkog lista“, jer se u njegovu tekstu navodi, da će „Prvi hrv.-slav.-dalm. „Lovački list“ izlaziti počam od 1. siječnja 1892. u Varaždinu 1. i 16. svakog mjeseca na cijelom arku, a uređivat će ga pl. Cseney Vuchetich M. i to će biti „glasilo koje će svim lov-cem prijateljem lova služiti za medju-sobni sporazum i dogovor, kako bi se podigao lov na onaj stepen, na koji će nam biti na zabavu i pouku“. Sa svoje strane, „Šumarski list“ preporuča svoj-in članovima prvi lovački list očekujući

da će se svi na njega i pretplatiti i podu-pirati ga svojim perom i savjetom.

Već 4. siječnja 1892. (Anon. 1892.b) javlja „Obzor“ da je izašao prvi broj Hrvatsko-slavonsko-dalmatinskog lovačkog lista u Varaždinu sa sljedećim sadržajem: Smjer i svrha lista, Srna, Dužnost lovca, Sitnice.

Jedanaest dana kasnije obraća se i „Hrvatska“ (Anon. 1892.c) na taj prvi broj spomenutog „Lovačkog lista“, u kojem se – uz ostalo priopćava njegov sadržaj:

„U uvodnom članku govor je o smje-ru i o svrhi lista, a ujedno se kratkim crtami prikazuje karakter i historički razvitak lovstva u obće, te njegov dulce cum utili. Iza toga sliedi početak vrlo poučnog članka o srni, zatim dužnost lovca, razne lovačke sitnice, književnost lovstva, izumi o lovstvu i t.d., napokon tržišne cene divljačine i krzna te kole-dar“.

Prema zapisu u listu „Škola“ (Anon. 1892.d) „Lovački list“ će donositi članke o lovu, kako se čuva korisna divljač, razne događaje iz lovačkog života i sve što se tiče lova i što može zanimati pri-jatelje lova.

U travnju iste godine, „Šumarski list“ (Anon. 1892.e) prenosi na molbu „Prvog hrv.-slav.-dalm. lovačkog lista“ sljedeću obavijest:

„Sa kolikimi je potežkoćam skop-čano izdavanje lista u provinciji, gdje ga susretaju razne neumoljive zaprieke, izkusio je dovoljno prvi naš „lovački list“ i u kratko vrijeme svoga života. Već pri štampanju drugog broja, koji je još i na tehničke zaprieke nasrnuo bio, pa se poradi toga dogotoviti mogao samo uz težke i zbilja ćutljive materialne

žrtve, pokazalo se, da će ove zaprieke i u buduću i to tako neuklonive biti kao sada, s toga moradosmo napustiti svaku misao o daljnjem izdavanju lista u Varaždinu. Pošto izdavateljem lista lebdi pred očima jedino čvrsta volja, da posluže interesom hrvatskoga lovstva, te da list tačno i valjano izlazi, preselilo se uredništvo iz Varaždina u Zagreb. Usljed ovih indikacija zaprieka dogodilo se, da je ne samo već drugi broj lista zakasniti morao, nego da smo prisiljeni bili uzprkos cijeloj našoj požrtvornosti, volje, rada i nastojanja ovaj put još razaslati iz isto bielog Zagreba čak i treći i četvrti broj lovačkog lista zakašnjenjem“.

Shvaćajući težak položaj i nemogućnost daljnjega izdavanja lista urednik Vuchetich predlaže Prvom obćem hrvatskom društvu za gojenje lova i ribarstva u Zagrebu (Anon. 1892.f) „neka prihvati rečeni list „Prvi hrvatsko-slavonsko-dalmatinski lovački list“ svojim javnim društvenim glasilom“. O tom je prijedlogu raspravljalo Društvo za gojenje lova i ribarstva na svojoj skupštini 17. ožujka 1892. u Zagrebu, kojom je prilikom Vuchetich izjavio, da je „spreman eventualno svoju ponudu i preinačiti u prilog društvu“. Na toj skupštini nije, međutim, došlo ni do kakvog zaključka. Umjesto dogovora izašao je u ožujku te godine prvi dvo-broj „Viestnika prvoga obćega hrvatskoga društva za gojenje lova i ribarstva“, a u „Uvodnom osvrtu članom i prijateljem društva lova i ribarstva“ pišu J. Jellachich i F. Ž. Kesterčanek (1892.):

„Upravni odbor društva, odlučio je temeljem zaključka druge glavne skupštine a odgovarajuće ustanovam

paragrafa 3. točke d, društvenih pravila, izdavati na ime društva list pod uredništvom tajnika“.

Nakon ovog zapisa u lipanjskom broju donosi „Viestnik“ (Anon. 1892.g) još jedan zapis:

„Prvi hrvatsko-slavonsko-dalmatinski lovački list pretiskuje marljivo članke našega „Viestnika“, činjenica koja svakako samo nama u prilog govori, tako da o tom ne bismo imali što dalje spominjati, kad bi se dotični organ pri tom držao i onoga, bar u Europi običajnoga načela, te da spominje izvor, od kuda mu odnosna viest ili članak, i stoga se nadamo, da će tako bar u buduću i slavno uredništvo „Lovačkog lista“ činiti“.

I konačno, zadnji zapis o tom „Prvom hrvatsko-slavonsko-dalmatinskom lovačkom listu“ nalazimo u „Lovstvu. Priručniku za lovce i poučnik za nadzirače lova u Hrvatskoj i Slavoniji“ (Kesterčanek, 1906.), gdje Kesterčanek pri zapisu o srni navodi:

„Vidi: Prvi hrvatsko-slavonsko-dalmatinski lovački list g. 1892, broj 1-4“.

Prema spomenutim zapisima može se smatrati sigurnim da su objavljena četiri broja „Prvog hrv.-slav.-dalm. lovačkog lista“ (Anon. 1892.e; Kesterčanek, 1906.). Iz citiranih se navija i objavljenih sadržaja prvog broja „Lovačkog lista“ može pretpostaviti da je, za tadašnje prilike, list bio opremljen dobrim tekstovima i zanimljivim sadržajem koji bi zaista mogli privući ljubitelje lova. Na žalost, list nije postao glasilo već postojećeg lovačkog društva i nije doživio podršku koju je očekivalo njegovo uredništvo.

Nejasno ostaje jesu li spomenuta četiri broja i jedini objavljeni brojevi „Lovačkog lista“. S tom se pretpostavkom ne slaže tekst u lipanjskom broju „Viestnika“. Ostaje jedina činjenica da nije uspjelo do danas, usprkos opsežnom traganju, pronaći ni jedan primjerak tih već sigurno objavljenih primjeraka „Lovačkog lista“ pa, ni onih za koje se samo može pretpostaviti da su bili objavljeni.

Sažetak

Potkraj 19. stoljeća počela su izlaziti kod nas dva mjesečnika i to: „Hrvatska pčela“ u Osijeku 1881. godine i „Viestnik prvoga obćega hrvatskoga društva za gojenje lova i ribarstva“ u Zagrebu 1892. godine. Budući da su se oba mjesečnika održala do danas, svrstavamo ih u najstarije naše mjesečnike s područja pčelarstva i lovstva. Ipak, i jedan i drugi mjesečnik imali su svog prethodnika: prvi je bio „Hrvatska pčela“, istoimeni sačuvani list od kojeg je izašao samo jedan broj 1. veljače 1877. u Varaždinu, a drugi pod imenom „Prvi hrvatsko-slavonsko-dalmatinski lovački list“ od kojega su izašla dva broja u siječnju 1892. u Varaždinu i dva u veljači iste godine u Zagrebu, ali od nijednog nije sačuvan ni jedan primjerak. Zbog novčanih neprilika predložio je vlasnik tog mjesečnika Prvom obćem hrvatskom društvu za gojenje lova i ribarstva da preuzme daljnje objavljivanje njegova lista, što društvo nije prihvatilo, već je umjesto njega počelo

izdavati vlastiti list „Viestnik prvoga obćega hrvatskoga društva za gojenje lova i ribarstva“. Ostaje, međutim, nejasno jesu li spomenuta četiri broja „Lovačkog lista“ jedini objavljeni brojevi. S tom se pretpostavkom ne slaže tekst koji donosi „Viestnik“ u svom lipanjskom broju.

Literatura

1. Anon. (1877): Različite viesti. Bolletino della Dalmazia – gospodarski list dalmatinski 6, 64 (15 febbraio 1877.).
2. Anon. (1892a): Prvi hrv.-slav.-dalm. „Lovački list“. Šumarski list 16, 48-49.
3. Anon. (1892b): Lovački list. Obzor 33 (2) 3 (4. siječnja 1892.).
4. Anon. (1892c): Lovački list. Hrvatska x (11) 3 (15. siječnja 1892.).
5. Anon. (1892d): Prvi lovački list. Škola 3, 34.
6. Anon. (1892e): Hrvatski „Lovački list“. Šumarski list 16, 191.
7. Anon. (1892f): Izvješće o drugoj glavnoj skupštini društva, održanoj dne 17. ožujka 1892. god. u Zagrebu. Viestnik prvoga obćega hrvatskoga društva za gojenje lova i ribarstva. 1, 7-14.
8. Anon. (1892g): Prvi hrvatsko-slavonsko-dalmatinski lovački list. Viestnik prvoga obćega hrvatskoga društva za gojenje lova i ribarstva. 1, (6) 62.
9. JELLACHICH, J. pl. i F. Ž. KESTERČANEK (1892): Članovom i prijateljem društva za gojenje lova i ribarstva. 1 (1-2).
10. KESTERČANEK, F. Ž. (1906): Srna. U: KesterčaneK, F. Ž.: Lovstvo. Priručnik za lovce i poučnik za nadzirače lova u Hrvatskoj i Slavoniji. Zagreb (24-30). Nakladnik Kr. hrv.-slav.-dalm. zemaljske vlade u Zagrebu. Tisak: Kr. zemaljska tiskara.

Predecessors of our oldest monthly publications Hrvatska pčela (1881) and Viestnik prvoga obćega Hrvatskoga društva za gojenje lova i ribarstva (1892)

Maks KARLOVIĆ, Ph.D., Retired Scientific Adviser, Zagreb

In late 19th century, two monthly publications were launched in Croatia: Hrvatska pčela (Croatian Bee) in Osijek in 1881, and Viestnik prvoga obćega hrvatskoga društva za gojenje lova i ribarstva (Herald of the First General Croatian Association for Hunting and Fisheries) in Zagreb, 1892. As both publications have continued until today, they are classified among our oldest monthly publications in the field of apiculture and hunting. However, both of them have their predecessors: the first was Hrvatska pčela, under the same name, of which only one issue came out on 1 February 1877 in Varaždin. The other under the name Prvi hrvatsko-slavonsko-dalmatinski lovački list (First Croatian-Slavonian-Dalmatian Hunting Gazette) came

out in two issues in January 1892 in Varaždin, and two in February of the same year in Zagreb. However, not a single copy has been preserved. Due to the financial difficulties, the owner of that monthly publication proposed to the First General Croatian Association for Hunting and Fisheries to assume the further publication of his gazette. However, the Association did not accept his proposal but instead started issuing its own Viestnik prvoga obćega hrvatskoga društva za gojenje lova i ribarstva. What is still unclear, however, is whether the mentioned four issues of Lovački list (Hunting Gazette) were the only published issues. A text published in Viestnik (Herald) in June issue does not agree with that assumption.

HRVATSKI SPOMENDANI. NAPISAO PROFESOR dr. RUDOLF HORVAT

23. travnja 1891, iznio je neki gradjanin u "Obzoru" ideju, da se u Maksimiru osnuje "Zoološki vrt". Trebalo je 40 godina, dok se ta ideja oživotvorile!

"Jutarnji list" (Zagreb), 8706, 8, 1936. (god. 25) (23. travnja 1936.).

Članovi kolegija Veterinarske stanice Županja 1966. godine

U jednom zapisu o veterinarskoj službi u Županji navodi Marko Kadić da je Veterinarsku stanicu Županja osnovao 1949. godine tadašnji kotarski veterinar Josip Marković u dvorišnim prostorijama nekadašnje gostione Osuško. Tijekom vremena - nakon rasformiranja vinkovačkog kotara - izdvaja se Županja 1963. godine kao posebna

općina i iduće godine ulaze u sastav već postojeće Veterinarske stanice Županja okolišne Ambulante u Babinoj Gredi, Bošnjacima, Cerni, Drenovcima, Gunji, Gradištu, Vrbanji i Županji. Na priloženoj fotografiji - snimljenoj 1966. godine - prisutni su članovi kolegija Veterinarske stanice Županja.



Stoje: 1. Radoslav RADOŠ - Drenovci, 2. Vladimir CEROVEČKI - Županja, 3. Josip FURY - Babina Greda, 4. Zvonimir TILJAK - Županja, 5. Zlatko KLARIĆ - Gunja, 6. Martin JAKOVAC - Gradište i 7. Dragan JURIC - Bošnjaci.
Čuč: 1. Boro PARMAČ - Vrbanja

Maks KARLOVIĆ

Riketron® N

Injekcijska otopina

antibakterijski lijek za sustavne infekcije, sulfonamid i trimetoprim za konje i goveda

Sastav

1 mL žute injekcijske otopine Riketron N sadržava:

Sulfadimidin natrij.....215,8 mg

Trimetoprim.....40 mg

Pomoćne tvari: bezalkohol, voda za injekcije.

N-metilpirolidon

Osnovna svojstva i djelovanje

Riketron N je kombinirani sulfonamidski pripravak potenciranog djelovanja. Aktivne tvari - sulfadimidin natrij i trimetoprim - osjetljivim bakterijama koče, na dva mjesta, sintezu folne kiseline. Time se postiže veća učinkovitost negoli što je očinje svaki od sastojaka zasebno. Kombinacija sulfadimidin-trimetoprim djeluje *in vitro* protiv mnogih gram-pozitivnih i gram-negativnih bakterija kao što su: *Actinobacillus spp.*, *Actinomyces bovis*, *Bordetella spp.*, *Cornebacterium spp.*, *E. coli*, *Fraxobacterium necrophorum*, *Haemophilus spp.*, *Klebsiella spp.*, *Listeria monocytogenes*, *Nocardia spp.*, *Pasteurella spp.*, *Proteus spp.*, *Salmonella spp.* te *Staphylococcus spp.* i *Streptococcus spp.* Potencirani sulfonamidi nisu učinkoviti protiv bakterija *Leptospira spp.*, *Pseudomonas spp.* i *Erysipelothrix rhusiopathiae*.

Indikacije

Liječenje početnih stadija infektivnih bolesti uzrokovanih bakterijama osjetljivim na kombinaciju sulfadimidin-trimetoprim u goveda, svinja i konja:

- primarne i sekundarne infekcije dišnog sustava (rinitis, bronhitis, pneumonija)
- Infekcije probavnog sustava (koli infekcije, salmoneloza, infekcije ustiju)
- Infekcije mokraćno-spolnog sustava (cistitis, uretritis, nefritis, metritis, MMA-sindrom krmaca, mastitis)
- infekcije nakon operacijskih zahvata i septikemije
- druge infekcije (nekrotični porfodermatitis, infekcije kože, papaka, oka, uha i dr.)

Način primjene i doze

Prije uvlačenja otopine u brizgalicu sadržaj u bočici treba dobro promućkati. Riketron N se aplicira i.m. u mišićne vrata ili sporo i.v. Doza Riketrona-a N iznosi 1 mL/15 kg t.m./dan (16 mg obje djelatne tvari/kg/dan), a u slučaju težih infekcija 1 mL/10 kg t.m./dan (24 mg obje djelatne tvari/kg/dan). Liječenje, u pravilu, traje 3-5 uzastopnih dana. Primjena treba nastaviti još najmanje 2 dana nakon što se povuku klinički znakovi infekcije.

* U konja se nakon i.v. primjene mogu javiti vrlo opasne šok reakcije. Riketron N se smije i.v. aplicirati samo ako je izravno ugrožen život jedinke. Prvo treba injicirati malu dozu i konja pažljivo promatrati; ako sve protekne dobro kasnije se može vrlo sporo injicirati preostali dio doze. Riketron N mora biti zgrijan na tjelesnu temperaturu. U slučaju prvih znakova akutne nepodnošljivosti primjenu treba prekinuti i započeti liječenje šoka.

Karencija

Meso i jestive iznutrice:

Svinja.....10 dana

Govedo i konj.....12 dana

Mlijeko krava.....5 dana

MRL status - svi sulfonamidi i trimetoprim razvrstani su u Aneks I

Rok valjanosti

Označen je na opremi, u originalnoj ambalaži 3 godine. Sadržaj načete bočice treba utrošiti u roku 28 dana.

Pakiranje

100 mL

Proizvođač

AmMedica d.o.o., Senden-Bosnel, S.R. Njemačka

Zastupnik

Centralna veterinarska agencija d.o.o., Zagreb, R. Hrvatska

Cjena

42,50 kn



GVA

ANIMEDICA

**SRETAN BOŽIĆ
I
NOVA GODINA**

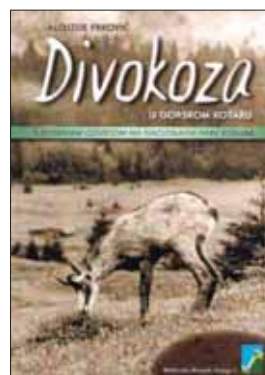


Divokoza u Gorskom kotaru s posebnim osvrtom na nacionalni park Risnjak

Autor: *Alojzije Frković*

Nakladnik: *Nacionalni park Risnjak, Crni lug*

Tisak: *Ermego d.o.o., Zagreb.*



Već ranije objavljenim publikacijama o smeđem medvjedu (2002.), risu (2003.) i vuku (2004.) Frković dodaje povijesni prikaz stanja divokoza u Gorskom kotaru unazad nekoliko posljednjih stoljeća. U ovoj sadašnjoj publikaciji autor je podijelio svoje djelo u nekoliko odvojenih područja:

- Uvod
- Prisučje i razvitak divokozje populacije Gorskog kotara kroz povijest
- Divokoza u Gorskom kotaru i u NP-u Risnjak danas
- Prirodoslovne značajke divokoze
- Uzgoj i zaštita divokoza
- Recenzije
- Korištena literatura
- Literatura o divokozi Gorskog kotara.

U svom razmatranju Frković koristi rijetke povijesne podatke o nekadašnjim

staništima divokoza u Gorskom kotaru, pri čemu ističe da je Gorski kotar bio stoljećima gotovo nepristupačan i neprohodan, što su uzrokovale bezbrojne planine prekrivene nepreglednim šumama. Pa tako i prvi pisani podatci potječu tek od 15. stoljeća, kad su prostranstva Gorskog kotara zaposjeli Frankopani i Zrinski. O divljači nalazimo prva spominjanja u pojedinim pjesmama Frana Krste Frankopana i posebno u Prvom hrvatsko-ugarskom zakonu o lovu iz prvih godina 16. stoljeća, gdje se navodi da je lov dlakave i pernate divljači zabranjen seljacima, ali da su ti isti seljaci dužni pružiti pomoć zemaljskoj gospodi u lovu na divokoze. Pogibijom P. Zrinskog i F. K. Frankopana u Bečkom Novom Mestu nova garnitura veleposjednika ne mijenja seljacima dotadašnja stečena prava, ali nova Urbarska regulacija dodaje prijašnjim

nevoljama seljaka zabranu posjedovanja oružja i držanje lovačkih pasa. Svim se tim zabranama održavala brojnost divokoza do Francuske revolucije, kad su njezine posljedice dale neočekivanu vlast potlačenim seljacima. Tako se dotadašnje krivolovstvo pretvorilo u bespoštedno uništavanje divljači, što se uspjelo promijeniti tek 1925. godine osnivanjem Saveza lovačkih društava za Hrvatsku i Slavoniju. Nažalost, i u takvim se novonastalim prilikama počelo razvijati novo krivolovstvo. Drugi svjetski rat samo je nastavio uništavanjem divokozjih uzgoja u Gorskom kotaru. Ipak, i u takvim nepovoljnim razdobljima divokoze su se u Gorskom kotaru održale.

Osnivanje Šumskog gospodarstva u Delnicama 1960. godine odrazuje se uređenjem dvaju velikih lovišta, to su „Risnjak“ na zapadu i „Bjelolasica“ na istoku. Nažalost, samo šest godina kasnije skupštine općina Delnice, Čabar i Rijeka razdjeljuju dotadašnju cjelovitost lovišta u nekoliko manjih lovišta i to se očituje ubrzo smanjenjem brojnosti divokoza.

Razmatrajući prikaz brojnosti divokoza i uzroke negativnih pomaka ističu se djelatnosti čovjeka i u jednom i drugom smjeru. Organizacija Nacio-

nalnog parka „Risnjak“ potaknula je početna istraživanja novog razvojnog puta divokoza, ali su ubrzo utvrđeni i nekadašnji negativni uzroci u razjedinjenim lovištima (krivolovstvo) pa zatim rascjepkanost lovišta, iskorištavanje šuma, planinarenje, veliko uznemiravanje, građevinski radovi, probijanje novih cesta, turizam praćen izletnicima, prometom vozila itd.).

U prirodoslovnim značajkama divokoze raspravlja se sistematika, tjelesne značajke, rogovi i njihov razvoj, način života, ponašanje, razmnožavanje i socijalna organiziranost divokoza.

U ovom sam se osvrtu posebno osvrnuo na autorove zabilješke o izmjenama brojnog stanja divokoza u Gorskom kotaru. Osim tih zapisa kojima autor posvećuje povijesno značenje i današnje posljedice nekadašnjih, ali na žalost i današnjih odnosa čovjeka i prirode, upotpunjavanjem cjelovitosti potrebnim razjašnjenjima stječemo stvarnu sliku stanja divokoza tijekom posljednjih nekoliko stoljeća.

Ostaje nam izraziti zahvalnost autoru za još jednu zanimljivu publikaciju o pojedinim vrstama divljači u Gorskom kotaru.

Maks KARLOVIĆ

Pitanje općinskih veterinara

Ovim pitanjem bavio se društveni odbor opetovano, a i u našem listu iznesena su načela, koja u tom pitanju vode društvo. Danas nam je dužnost konstatirati, da se ovim pitanjem bavi vrhovna zemaljska i veterinarska uprava i da se tamo ozbiljno radi na tom, kako bi bilo što više opć. veterinara namješteno. Dokaz neka čini naredba kr. zem. vlade od 26. X. 1912. broj III. B. 2736/I, koja glasi ovako:

„Ovdašnjom okrižnicom od 22. listopada 1911. br. III. B. 6297. kojom je potaknuto pitanje glede namještenja općinskih veterinara nije postignut željeni uspjeh. Od vremena, od kada je ta okružnica izdana, namješten je samo jedan općinski veterinar i to u Virovitici, premda glasom predležućih izvještaja Kr. županijskih oblasti imade u području zemlje više kotara, u kojima kotarski veterinar ne dopijeva da u redovitim prilikama savjestno obavi poslove, koje prema ustanovama zakona od 27. kolovoza 1888. o uređenju veterinarstva u kraljevinama Hrvatskoj i Slavoniji spadaju u njegov djelokrug.

Poziva se Kr. županijska oblast, da dade ponovno izazvati zaključke zastupstva onih općina, u kojima bi bilo nužno, da se namjesti posebni općinski veterinar.

Kod rasprave pitanja o namještenju općinskih veterinara za više općina zajedno, valja da županijska oblast temeljem ustanove paragrafa 129. gore spomenu-

tog veterinarskog zakona, označi sjedište dotičnog veterinara. Općinska zastupstva valja napose upozoriti na ustanove paragrafa 132. gore citiranog vet. zakona, prema kojoj su općine, koje inadu svoga vlastitoga veterinara, proste od plaćanja vet. tangente. U općinama, gdje se obdržavaju nedjeljni marveni sajmovi, odpasti će troškovi izaslanja, kotarskog veterinara radi nadzora tih sajmova. Izuzev dakako slučajeva, gdje je nužno, da nadzor tih sajmova vrši više veterinara, nu i u takvim slučajevima pristediti će svakako općine izaslanje jednog veterinara iz vana, a samo se po sebi razumije, da će se u općinama, koje će imati vlastitog veterinara, znatno smanjiti troškovi, nastali izaslanjem kotarskog veterinara u veterinarskim i stočarskim poslovima, koji spadaju u djelokrug općinskog veterinara, nu koje poslove moraju sada u pomanjkanju općinskih veterinara, obavljati kotarski veterinari. U sjednicama općinskih zastupstva valja još prije stvaranja zaključka upozoriti općinske zastupnike na sve gore navedene okolnosti te izazvati zaključke ne samo onih općina, gdje bi općinski veterinar imao svoje sjedište, već i onih općina koje bi eventualno na prvo spomenutim općinama imale zajedno uzdržavati posebnoga općinskoga veterinara“.

Ovoliko smo držali potrebnim objaviti svima, koji se za stvar zanimaju i kojih se tiče.

„Veterinarski vjesnik“ (Zagreb), 2, 47, 1913 (god. 9).

IN MEMORIAM

Miroslav LEDERER, rođen 13. 10. 1949. u Osijeku, diplomirao 22. 2. 1978. u Veterinarskom fakultetu Zagreb. Radio kao pripravnik, odnosno veterinar u Veterinarskoj stanici Osijek – Ambulanta Dalj (1978. – 1986.), a od 1986. do 1991. kao upravitelj i od 1991. do 2008. kao direktor Veterinarske stanice Osijek. Tijekom Domovinskog rata sudjeluje aktivno u akcijama zbrinjavanja stoke i spriječavanja širenja stočnih zaraznih bolesti. Pri jednoj takvoj akciji (19. 7. 1991.) bio je zarobljen, ali istog popodneva i oslobođen. Kao direktor Veterinarske stanice Osijek bio je predsjednik Osječko-baranjske podružnice Hrvatske veterinarske komore, a kasnije i podpredsjednik iste Komore itd. Umro 18. 10. 2008. u Osijeku.

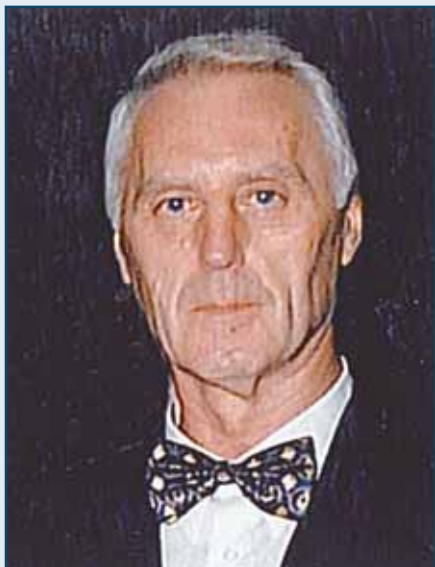
Vlado IVŠAN, rođen 28. 3. 1960. u Osijeku, diplomirao 4. 12. 1986. u Veterinarskom fakultetu Zagreb. Radio kao veterinar u Veterinarskoj stanici Osijek – Ambulanta Ernestinovo (1987. – 1994.) i kao ovlašteni veterinar na epizootiološkom području Osijek (1994. – 2008.). Bio sudionik Domovinskog rata. Umro 12. 11. 2008. u Osijeku.

Ivan NEMET, rođen 12. 1. 1945. u Mila-nlugu (Čaglin), diplomirao 23. 4. 1974. u Veterinarskom fakultetu Zagreb. Radio kao veterinarski pripravnik u Pleternici (1975. – 1978.), u Veterinarskoj stanici Podravska Slatina – Ambulanta Čađavica (1978. – 1990.). U iduće dvije godine sudjeluje aktivno u Domovinskom ratu (1990. – 1992.), kad se vraća u Veterinarsku stanicu Podravska Slatina, gdje ostaje do odlaska u mirovinu (1992. – 1997.). Umro 19. 11. 2008. u Čađavici.

Josip PERIĆ, rođen 12. 3. 1936. u Osijeku, diplomirao 26. 9. 1961. u Veterinarskom fakultetu Zagreb. Radio kao veterinar u PIK-u „Belje“ – Mirkovac (1961. – 1962.), u PIK-u „Belje“ Mece – Darda – Poljoprivredno dobro Čeminac (1962. – 1964.), u PIK-u „Belje“ Darda (1965.) i u Veterinarskom fakultetu Zagreb do odlaska u mirovinu (1965. – 2006.). Umro 13. 4. 2009. u Zagrebu.

Maks KARLOVIĆ

In memoriam prof. dr. sc. Josip Perić



Kako opisati stanje duše nakon što u nedjelju s čovjekom izmijeniš uskršnje čestitke, a o podne narednog dana stigne vijest da je otišao na vječni istok. U kolopletu osjećaja, nevjerice i tuge sakupismo se da u tišini odra budemo nijemi svjedoci njegova posljednjeg putovanja. Kako odjednom spoznati realnost istine i suočiti se s njome, još na to pitanje jednostavno nemam odgovora.

Prof. dr. sc. Josip Perić se 1936. godine rodio u Osijeku gdje završava osnovno i srednje obrazovanje, a potom upisuje studij veterine u Zagrebu, gdje 1961. godine diplomira. Po završenom studiju upošljava se kao terenski veterinar u PIK „Belje“, gdje ostaje do 1965. godine. Iste godine izabran je za honorarnog asistenta Zavoda za opću patologiju i patološku morfologiju Veterinar-

skog fakulteta u Zagrebu, a naredne godine stupa u stalni radni odnos na istom Zavodu. Već za svog stručnog usavršavanja na matičnom Zavodu 1968. godine počinje obavljati poslove asistenta u Zavodu za sudbeno i upravno veterinarstvo. Završava poslijediplomski studij, magistrira, a potom izrađuje i s uspjehom brani doktorsku disertaciju 1974. godine. 1977. godine habilitira i na izričit zahtjev tadašnjeg predstojnika prof. dr. sc. Mate Winterhaltera dolazi kao docent na Zavod sudbeno i upravno veterinarstvo gdje je izabran u znanstveno-nastavno zvanje za predmet Upravno i Sudbeno veterinarstvo, a po umirovljenju prof. Winterhaltera postaje predstojnikom istog Zavoda. Godine 1983. izabran je u zvanje izvanrednog, a 1988. godine u redovnog profesora za predmete Upravno i Sudbeno veterinarstvo. Godine 1993. svoje znanstveno-nastavno napredovanje dovršava izborom u trajno zvanje redovnog profesora. Nakon pune 43 godine radnog staža i 30 godina predstojništva prof. Perić odlazi u zasluženu mirovinu.

Tijekom svog nastavničkog vijeka sam je ili u suradnji objavio više desetaka stručnih i znanstvenih radova, a kao sudski vještak 200 - tinjak forenzičkih ekspertiza i upravnih predmeta. Bio je mentor u izradi 65 diplomskih radova iz različitog područja forenzičke veterinarske medicine i upravnog veterinarstva.

Utemeljitelj je i realizator novih izbornih predmeta kao što su Veterinarska inspekcija i veterinarsko javno zdravstvo te Patološka morfologija i forenzičko prosuđivanje.

Aktivni je nastavnik svih oblika nastave na sedam poslijediplomskih studija znanstvenog i specijalističkog tipa.

Pod njegovih mentorstvom troje ljudi obranilo je magistarsku raspravu. Apsolutni rekord prof. Perić nosi u jednoj djelatnosti, a ta je da je održao preko 6.000 uspješno položenih ispita.

U toplini vlastitoga doma prof. dr. Josip Perić bio je dobar i odan suprug ženi Boženi te nježan i brižan otac sinu Igoru i kćeri Tamari. Sjećam se njegova silnog veselja kada se Igor zaposlio ili beskrajnoj sreći kada je diplomirala Tamara, koja je u njegovu srcu imala neko posebno mjesto. A s koliko je tek nježnosti i ljubavi govorio o unuci Piji.....!!

Opraštajući se od Vas pamtit ćemo Vas kao člana akademske zajednice, uvaženog redovnog sveučilišnog profesora, jednog od najpoznatijih sudskih vještaka za pitanja veterinarske medicine ovih prostora, vrsnog stručnjaka iz područja sudbenog i upravnog veterinarstva, veterinarskog stručnjaka par excellence, velikog čovjeka i dragog prijatelja. Želim to učiniti u osobno ime te u ime mnogih drugih. Potrebitim držim naglasiti barem neke, dekana i svih prodekana Veterinarskog fakulteta, članova Fakultetskog vijeća u širem sastavu, svih djelatnika Veterinarskog fakulteta, sadašnjih i bivših studenata Vet-

erinarskog fakulteta te mnogih veterinarara, kolega, štovatelja i mnogih prijatelja.

Hvala Vam dragi profesore, na svemu Vam hvala što ste učinili i po čemu ćemo Vas pamtit i kao jednog od posljednjih izdanaka stare škole sveučilišnih profesora.

Jednom si prijatelju slušao kako govorim stihove Vjekoslava Majera. Rekao si na kraju: „Brko, promašio si profesiju“. Pretpostavljam da Ti se dopalo. Stoga sam Ti odredio pročitati pjesmu Mehmedalije Maka Dizdara – Smrt

*Zemlja je smrtnim sjemenom posijana
Ali smrt nije kraj. Jer smrti zapravo i nema*

*I nema kraja. Smrću je samo obasjana
Staza uspona od gnijezda do zvijezda.*

Sjećam se kada sam kao mali čuo od svog vjeroučitelja da kad umre dijete, postane anđelom nebeskim. Mnogo godina kasnije čuo sam da kad umre dobar čovjek, postaje zvijezdom na nebu. Gledajući sinoć nebo učinilo mi se kao da sam vidio novu zvijezdu, ne znam je li odista bila ili sam samo želio da tako bude. I na kraju, zbogom prijatelju i neka ti je ova naša hrvatska gruda laka.

Ali, ako Ti ipak imaš neke veze s onom zvijezdom sinoć, znaj, ja opet gledat ću Te noćas.

Mirogoj, 06. travnja 2009.

Antun BRKIĆ

- 1) Časopis "Veterinarska stanica" objavljivat će u prvom redu članke o djelatnosti veterinarskih stanica imajući pri tome na umu njihovu javnu funkciju propisanu zakonima, pravilnicima, uredbama i drugim propisima. Pritom će se objavljivati članci o ustrojstvu veterinarskih stanica i o njihovoj preobrazbi u skladu s razvojem društvenih odnosa na selu.
- 2) "Veterinarska stanica" nastojat će pružati stručnjacima nove spoznaje iz znanosti i napose prakse u zemljama s razvijenim stočarstvom.
- 3) U našem časopisu tiskat će se znanstvene i stručne rasprave prije svega za stručnjake koji rade u veterinarskim stanicama i ambulantama.
- 4) Bit će u njemu i društvenih vijesti, obavijesti, najava i osvrta na znanstvene i stručne skupove i sl.
- 5) Objavljivat ćemo referate od posebna interesa za neposrednu praksu, zatim prikaze knjiga i drugih publikacija.
- 6) Tekstovi originalnih i stručnih rasprava te onih iz povijesti veterinarstva i prikazi obljetnica mogu imati pet do deset kartica (pisanih u MS Wordu, veličina fonta 12, prored 1,5), međutim, u iznimnim slučajevima prihvatit će se i veći broj kartica. Mišljenja, prijedlozi i sučeljavanja dvije do pet kartica.
- Literarni zapisi četiri do deset kartica.
- 7) Tekstove je potrebno pisati u MS Wordu, font 12, srednji prored (1,5) ili na pisaćem stroju, srednje veliki prored. Svaki novi stavak mora početi s uvučenim retkom.
- 8) Autore treba u tekstu citirati na sljedeći način:
 - a) ako je jedan autor: Nicolet (1975.).
 - b) ako su dva autora: Adamović i Jurak (1938.).
 - c) ako su tri ili više autora: Lojkić i sur. (1978.).
- 9) Sve što se obrađuje mora imati oblik primjeren obradi materije u znanosti i struci. Uredništvo može zahtijevati od autora da popravi svoj prilog ili ga može odbiti.
- 10) Svaka rasprava mora imati kratak sažetak
- 11) Ističemo napose da svi grafikoni moraju biti izrađeni u Microsoft okruženju na računalu ili u nemogućnosti izrade na računalu na paus-papiru, a fotografije (obične i digitalne) takve kvalitete da se mogu uspješno reproducirati.
- 12) Rukopisi se ne vraćaju.
- 13) U pregledu literature potrebno je navoditi samo autore koji se citiraju u raspravi i to prema uputama koje se prilažu:

1. **knjiga:** HAFEZ, E. S. E. (1986):
Adaption of domestic animals.
Philadelphia: Lea and Febinger.
2. **rasprava u knjizi:** MAURER, F. D.,
R. A. GRIESEMER and T. C. JONES
(1959): African swine fever. U:
DUNNE, H. W.: Diseases of swine.
Ames, Iowa (145 - 158).
3. **disertacija:** KRSNIK, B. (1972):
Utjecaj buke na ponašanje svinja u
industrijskoj proizvodnji, napose
s obzirom na lako oksidirajuće
tvari kao biokemijskom parametru.
Disertacija. Veterinarski fakultet
Sveučilišta u Zagrebu.
4. **zbornik referata:** SANKOVIĆ, F. (1986):
Kirurške bolesti u intenzivnom uzgoju
preživača. Izvješća sa X. znanstvene
konferencije "Veterinarska biomedicina
i tehnika" (Zagreb, 15. i 16. studenoga
1984). Zbornik referata. Zagreb (suppl.
S1 - S8).
5. **zbornik sažetaka:** ČAJAVEC, S., Ljil-
jana MARKUŠ CIZELJ, S. CVETNIĆ
i M. LOJKIĆ (1985): Seroški odziv
svinja na eksperimentalnu inakti-
viranu vakcinu bolesti Aujezskoga.
Kongres mikrobiologa Jugoslavije
(Poreč, 24. - 28. rujna 1985). Zbornik
plenarnih predavanja i sažetaka
priopćenja. Zagreb (104).
6. **časopis:** LANCASTER, M. B. (1973):
The occurrence of *Streptocara* sp. in
Ducks in Britain. Vet. Rec. 92, 261 -
262.
7. **časopis u kojem svaki broj počinje
sa stranicom 1:** PAVUNA, H., i
R. ŠIC (1983): Utjecaj genetskih
čimbenika na plodnost goveda. Vet.
stanica, 14 (4) 1-7.
8. **neka druga rasprava:** BOLLWAHN,
W. und B. KRUEDEWIG (1972): Die

symptomatische Behandlung der
Gratschstellung neugeborener Fer-
kel. Dtsch. tierärztl. Wschr. 79, 229
-231 (Cit. HÄNI, H., A. BRÄNDI,
H. LUGINBÜHL, R. FATZER, H.
KÖNIG und J. NICOLET: Vorkom-
men und Bedeutung von Sch-
weinekrankheiten: Analyse eines
Sektionsguts (1971 - 1973) Schweiz.
Arch. Tieheilk. 118, 105 - 125, 1976).

9. **sažetak u nekom časopisu:**

NORVEL, R. A. I. (1981): The ticks
of Zimbabwe. III. *Rhipicephalus*
evertsi evertsi. Zimbabwe Vet. J. 12
(2 - 3) 31 - 35 (Ref. Veterinarstvo, 33,
21, 1983).

Predaja rukopisa:

Jednu kopiju rukopisa zajedno sa
kompjuterskim zapisom u Microsoft
Word programu na disketi od 3.5 inča
ili CD disku molimo poslati na adresu
glavnog urednika:

Doc. dr. sc. Marko Samardžija, Veteri-
narski fakultet, Heinzelova 55, 10000
Zagreb.

Radovi se mogu poslati i samo
elektroničkom poštom na e-mail:
smarko@vef.hr bez tiskanog primjerka.

Svaki autor treba navesti:

Akademski stupanj, naziv i adresu
organizacije u kojoj radi, zvanje i funk-
ciju u organizaciji u kojoj radi.

Radi lakšeg kontakta molimo autore
da navedu broj telefona, telefaksa i
elektroničku adresu (e-mail).

Brojevi telefona i telefaksa neće biti
objavljivani u časopisu.